

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับใช้คัดเลือกสปีเย่หุ้มเมล็ดและ
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวดำ



ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2564

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับใช้คัดเลือกสปีชีส์เหี่ยวแห้งและ
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวดำ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับใช้คัดเลือกสปีชีส์เห็ดและ
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวดำ

ธัญพรรณ ทอง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุนสิงหาโรจน์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิจ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพเยาว์ คบพิมาย)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน

อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับใช้คัดเลือกสีเยื่อหุ้มเมล็ดและ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวดำ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวธัญพรรณ ทอง
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์

บทคัดย่อ

ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำเกิดจากการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งถูกควบคุมโดยยีนสำคัญ คือ ยีน *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนดังกล่าว จะสามารถช่วยคัดเลือกข้าวที่มีแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* คัดเลือกเครื่องหมายที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ ตรวจสอบลูกผสม F_1 ประชากร F_2 และ BC_1F_1 และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด จากการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR พบเครื่องหมาย RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับและข้าวพันธุ์ให้ และตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้ การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร F_2 พบว่า การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมาย RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) และ RM15209 (*OsMYB3*) เป็นไปตามกฎเมนเดล คือ 1: 2: 1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบต้นที่มีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้เคียงกับพันธุ์ให้ก้าน้อย การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 41.30 และ 6.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) ร่วมกับ RM15209 (*OsMYB3*) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($p < 0.05$) โดยค่า R^2 มีค่าสูงขึ้น เท่ากับ 46.64 เปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร BC_1F_1 พบว่า การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) เป็นไปตามกฎเมนเดล คือ 1: 1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน พบต้นที่มีค่าสูงกว่าข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า อัตราส่วนการเกิดสี: ไม่เกิดสี เท่ากับ 1: 1 โดยการ

เกิดสีเขียวเข้มเมล็ดต้องมีอัลลีลเด่นของพันธุ์ให้ก้าน้อย อย่างน้อย 1 อัลลีล เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 30.59 และ 41.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (*OsMYB3*) มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 5.76 และ 7.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) ร่วมกับ RM15209 (*OsMYB3*) กับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 32.69 และ 44.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ เครื่องหมาย RM17321 (*OsB1&B2*) มีความสัมพันธ์กับสีเขียวเข้มเมล็ดสูงมาก ($p < 0.05$) โดยมีค่า r เท่ากับ 0.886 อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 (*OsDFR*) ไม่มีความสัมพันธ์กับทุกลักษณะที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) ซึ่งเป็นเครื่องหมายหลัก ร่วมกับ RM15209 (*OsMYB3*) ซึ่งเป็นเครื่องหมายรอง จะสามารถใช้ในการคัดเลือกข้าวที่เขียวเข้มเมล็ดมีสี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานินสูง และช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ด้วยวิธีผสมกลับได้

คำสำคัญ : ข้าว, เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, แอนโทไซยานิน, สีเขียวเข้มเมล็ด

Title	STUDY ON DNA MARKERS FOR SELECTION OF PERICARP COLOR AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN BLACK RICE
Author	Miss Thanyapat Thong
Degree	Master of Science in Genetics
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Chotipa Sakulsingharoj

ABSTRACT

Black pericarp rice was mainly due to anthocyanin synthesis which is controlled by important genes, including *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* and *OsMYB3*. The DNA markers linked to these genes could be used for selection of rice with high anthocyanin content and antioxidant activity. This research aimed to study the SSR markers linked to *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* and *OsMYB3* genes and select the markers which could distinguish between white and black pericarp rice, and examine F_1 hybrid rice, F_2 progenies and BC_1F_1 population. In addition, the study of relationship between the SSR markers and phenotypes of antioxidant activity, anthocyanin content and pericarp color were investigated. It was found that RM17321, RM11383 and RM15209 linked to *OsB1&B2*, *OsDFR* and *OsMYB3* genes, respectively were able to distinguish between recipient and donor parent and detect F_1 hybrid. The RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) and RM15209 (*OsMYB3*) markers were validated in F_2 progenies. The chi-square test of marker inheritance showed the segregation ratio of 1: 2: 1 in all markers, following Mendelian law. Analysis of antioxidant activity revealed that some F_2 -plant had high antioxidant activity similar to that of Kham Noi. The RM17321 (*OsB1&B2*) and RM15209 (*OsMYB3*) markers were related with antioxidant activity, which had R^2 equivalent to 41.30% and 6.22%, respectively ($p < 0.05$). The relationship of RM17321 (*OsB1&B2*) and RM15209 (*OsMYB3*) interaction with antioxidant activity was found with higher R^2 of 46.64% ($p < 0.05$). The SSR markers were validated in BC_1F_1 population. The chi-square test of inheritance of RM17321 (*OsB1&B2*) and RM15209 (*OsMYB3*) marker showed the

segregation ratio of 1: 1, following Mendelian law. Analysis of antioxidant activity and anthocyanin content revealed that some BC₁F₁-plants had antioxidant activity and anthocyanin content higher than those of Kham Noi. Analysis of pericarp color demonstrated the segregation ratio of color: colorless was 1: 1, suggesting that pigmentation in pericarp might require at least one allele from Kham Noi. Analysis of relationship between the SSR markers and the phenotypes of antioxidant and anthocyanin content indicated that RM17321 (*OsB1&B2*) marker was related with antioxidant activity and anthocyanin content which had R² equivalent to 30.59% and 41.29%, respectively (p<0.05). The RM15209 marker was related with antioxidant activity and anthocyanin content which had R² equivalent to 5.76% and 7.35%, respectively (p<0.05). The interaction of RM17321 (*OsB1&B2*) and RM15209 (*OsMYB3*) markers was related with antioxidant activity and anthocyanin content which had R² equivalent to 32.69% and 44.69%, respectively (p<0.05). In addition, RM17321 (*OsB1&B2*) marker was related with pericarp color which had correlation (r) equivalent to 0.886 (p<0.05). However, the RM11383 (*OsDFR*) markers was not related with all phenotypes in this study. Thus, RM17321 (*OsB1&B2*) and RM15209 (*OsMYB3*) markers could be used for selection of rice with colored pericarp, high antioxidant activity and anthocyanin content in rice improvement by backcrossing.

Keywords : Rice, SSR Markers, Antioxidant Activity, Anthocyanin, Pericarp Color

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ บัณฑิตย ที่ได้กรุณารับเป็นประธาน กรรมการที่ปรึกษาในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นผลงานที่ผู้วิจัยมีความมุ่งมั่น ตั้งใจ และพยายามอย่างเต็มที่ ในการศึกษาและทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จะไม่สามารถสำเร็จได้ ถ้าไม่ได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ ที่คอยอบรมสั่งสอน ถ่ายทอดวิชาความรู้ รวมถึงให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือใน ด้านต่าง ๆ ตลอดจน ตลอดจนการสนับสนุน วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และห้องปฏิบัติการตลอดระยะเวลา ในการดำเนินงานวิจัยทั้งหมดจนเสร็จสิ้น รวมทั้งกรุณาช่วยตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จน สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณอาจารย์ไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต และผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร.วรารณ แสงทอง ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในด้านงานวิจัย หลักการในการ แก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ขอขอบพระคุณอาจารย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณะ ลานน้ำเที่ยง ที่ให้ คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติ จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ มารดา ที่คอยสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษา น้องสาวและครอบครัว ที่คอย เป็นกำลังใจ และแรงผลักดันจนสำเร็จการศึกษา ขอขอบคุณพี่ น้อง ๆ ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ และ เพื่อน ๆ แม่ใจ ที่ไม่ได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้ ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจเสมอมา และขอบคุณตัวเอง ที่มีความพยายาม อดทน ไม่ยอมแพ้ต่ออุปสรรคต่าง ๆ จนงานวิจัยสำเร็จได้อย่างที่ตั้งใจไว้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครู อาจารย์ทุกท่านจากทุกสถาบันที่เคยร่ำเรียนศึกษา รวมทั้ง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาให้ข้าพเจ้ามีความรู้และความสามารถเพื่อนำไปใช้ในการ พัฒนาตัวเองต่อไป

ชญพรธน์ ทอง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฐ
สารบัญตาราง.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	4
แหล่งกำเนิดและชนิดของข่าว.....	4
ลักษณะการเจริญเติบโตของข่าว	5
ข่าวไทย	8
ข่าวพื้นเมืองของไทย.....	9
คุณค่าทางโภชนาการของข่าว.....	10
ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของข่าว.....	11
ฟลาโวนอยด์.....	13
แอนโทไซยานิน.....	14
การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	15
ยีนโครงสร้าง.....	16

ยีนควบคุม	17
การวิวัฒนาการของยีนต้นกำเนิดข้าวดำ	19
การวิเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว	21
การปรับปรุงพันธุ์ข้าว	22
การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีผสมกลับ	23
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ	25
เครื่องหมายดีเอ็นเอ	26
เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR	26
การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	30
วัสดุและอุปกรณ์	30
เครื่องมือ	32
สารเคมี	33
ดีเอ็นเอมาตรฐาน	34
เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR	34
วิธีดำเนินการวิจัย	35
1. การศึกษาพันธุ์ข้าว และสร้างประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ข้าวที่ 1 (BC_1F_1)	36
2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนข้าวด้วยวิธี mCTAB	38
3. การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR	42
4. การทดสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ พันธุ์รับ พันธุ์ให้ และลูกผสม F_1	44
5. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร F_2	46
6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร F_2	53

7. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร BC_1F_1	54
8. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฟีโนไทป์ ในประชากร BC_1F_1	57
9. การคัดเลือกต้น BC_1F_1 และผลิตเมล็ด BC_2F_1	57
สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย	58
สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	58
ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	58
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	59
1. การศึกษาพันธุ์ข้าว และสร้างประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ช่วงที่ 1 (BC_1F_1).....	59
2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว.....	61
2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เพลท 96 ช่อง	61
2.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร.....	61
3. การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR.....	63
4. การทดสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ พันธุ์รับ พันธุ์ให้ และลูกผสม F_1	70
4.1 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ.....	70
4.2 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ.....	88
4.3 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร F_2 บางส่วน	91
5. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร F_2	92
5.1 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR.....	92
5.2 การทดสอบโคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายชนิด SSR.....	95
5.3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในประชากร F_2	96
6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ...	98
6.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ANOVA.....	98

6.2 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Pearson correlation	103
6.3 การวิเคราะห์ถดถอยระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	103
7. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร BC ₁ F ₁	105
7.1 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR.....	105
7.2. การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR	110
7.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	111
7.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH Differential	112
7.5 การวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด	113
7.6 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน <i>OsRc</i>	118
8. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC ₁ F ₁	120
8.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	120
8.2 ปริมาณแอนโทไซยานิน.....	126
8.3 สีเยื่อหุ้มเมล็ด.....	131
8.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์.....	136
8.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร BC ₁ F ₁ เพิ่มเติม...	138
9. การคัดเลือกต้น BC ₁ F ₁ และผลิตเมล็ด BC ₂ F ₁	142
9.1 การคัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ของทุกเครื่องหมาย และตรวจสอบด้วย เครื่องหมายที่ทราบอีกข้างหนึ่งของยีน	142
9.2 การผลิตเมล็ดข้าวผสมกลับครั้งที่ 2 ช่วงที่ 1 (BC ₂ F ₁).....	144
9.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	146
9.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential	147
9.5 การวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ดบนต้นคัดเลือก BC ₁ F ₁	148
9.6 การวิเคราะห์ฟีโนไทป์ของต้นคัดเลือก BC ₁ F ₁ ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้.....	148

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	152
บรรณานุกรม.....	157
ภาคผนวก.....	168
ภาคผนวก ก การสกัดดีเอ็นเอ	169
ภาคผนวก ข การตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 และ BC_1F_1	177
ภาคผนวก ค ข้อมูลจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร F_2 และ BC_1F_1	199
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดเพิ่มเติม โดยกำหนดให้ กลุ่มไม่มีสี ให้คะแนนเป็น 0 และกลุ่มมีสี ให้คะแนนเป็น 1	210
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ถดถอยในประชากร F_2 และ BC_1F_1 (อธิบายสมการถดถอย).....	215
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์เพิ่มเติมในประชากร BC_1F_1 (โดยไม่นำต้นที่มียีน Rc ที่ทำงานได้มาวิเคราะห์).....	224
ประวัติผู้วิจัย.....	239

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ส่วนประกอบของข้าว a) ลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้น และ.....	7
2 โครงสร้างทางเคมีของ a) Cyanidin 3-glucoside และ.....	14
3 การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว	15
4 วิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว	17
5 แผนผังแสดงการผสมกลับทั้ง 2 กรณี	24
6 ตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีนสำคัญ 3 ยีน.....	29
7 การผสมข้าวด้วยวิธีการใช้น้ำร้อน	38
8 การเรียงตัวอย่างของประชากร F_2 ในวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เพลท 96 ช่อง เพลทที่ 1.....	39
9 การเจือจางดีเอ็นเอของประชากร F_2 และ BC_1F_1 ในเพลท 96 ช่อง.....	41
10 แผนที่ตำแหน่งเครื่องหมาย RM และตำแหน่งยีน <i>OsB1</i> , <i>OsB2</i> , <i>OsDFR</i> และ <i>OsMYB3</i>	44
11 การทำเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ปิเปตแบบหลายช่อง	48
12 การเตรียมสารมาตรฐาน Trolox ในเพลทสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	50
13 การเตรียมตัวอย่างในเพลทสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH'.....	51
14 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดในเพลท 96 ช่อง สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน	56
15 ประชากร BC_1F_1 ที่ปลูกในโรงเรือน จำนวน 321 ต้น.....	60
16 แผนผังการสร้างประชากร BC_1F_1 และผลิตเมล็ด BC_2F_1	60
17 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 บางส่วน จากทั้งหมด 288 ต้น.....	61
18 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ.....	62
19 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 ทั้งหมด 12 ต้น	62
20 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร BC_1F_1 บางส่วน จากทั้งหมด 318 ต้น	63
21 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน <i>OsB1&B2</i>	73

22	การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsDFR</i>	79
23	การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsMYB3</i>	85
24	เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsB1&B2</i> จำนวน 5 เครื่องหมาย.....	88
25	เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsDFR</i> จำนวน 6 เครื่องหมาย	89
26	เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsMYB3</i> จำนวน 7 เครื่องหมาย	90
27	การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209	91
28	ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน <i>OsB1&B2</i>	92
29	ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน <i>OsDFR</i>	93
30	ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน <i>OsMYB3</i>	94
31	ฮิสโทแกรม (Histogram) แสดงการกระจายของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของประชากร F_2	96
32	ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์แบบ KK, KP และ PP.....	100
33	ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์จำนวน 9 แบบ.....	102
34	ตัวอย่างผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน <i>OsB1&B2</i>	106
35	ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน <i>OsB1&B2</i>	106
36	ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ที่จำเพาะกับยีน <i>OsB1</i>	107
37	ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน <i>OsDFR</i> บางส่วน	108
38	ตัวอย่างผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน <i>OsMYB3</i>	109
39	ฮิสโทแกรม (Histogram) แสดงการกระจายของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดข้าว	111
40	ฮิสโทแกรม (Histogram) แสดงการกระจายของปริมาณแอนโทไซยานินของเมล็ดข้าว	112
41	ลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวในประชากร BC_1F_1 ทั้งหมดจำนวน 258 ต้น	115
42	การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel ที่จำเพาะต่อยีน <i>OsRc</i>	118
43	ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์แบบ KP และ PP.....	122
44	ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์ จำนวน 4 แบบ	124
45	ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของจีโนไทป์แบบ KP และ PP	127

46	ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของจีโนไทป์ จำนวน 4 แบบ.....	129
47	ค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ด ของจีโนไทป์แบบ KP และ PP	133
48	ค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ดของจีโนไทป์จำนวน 4 แบบ	135
49	การตรวจสอบจีโนไทป์ของต้นคัดเลือกจำนวน 15 ต้น ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้	142
50	การผลิตเมล็ด BC_2F_1 ด้วยวิธีผสมกลับ	144
51	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสกัดจากเมล็ดข้าวของต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จำนวน 15 ต้น.....	146
52	ปริมาณแอนโทไซยานินสกัดจากเมล็ดข้าวของต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จำนวน 15 ต้น ...	147
53	สีเยื่อหุ้มเมล็ด BC_1F_2 บนต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จำนวน 15 ต้น.....	148
54	ฟีนอลของต้นคัดเลือก BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้จำนวน 15 ต้น	149
55	การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel ที่จำเพาะต่อยีน <i>OsRc</i>	151



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ยีนควบคุมและยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด..	42
2 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsB1&B2</i> จำนวน 22 เครื่องหมาย	64
3 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsDFR</i> จำนวน 24 เครื่องหมาย.....	66
4 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsMYB3</i> จำนวน 22 เครื่องหมาย.....	68
5 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsB1&B2</i>	74
6 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsDFR</i>	80
7 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน <i>OsMYB3</i>	86
8 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอ	95
9 จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209.....	97
10 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2	99
11 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2	101
12 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร F_2	103
13 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	104
14 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2	104
15 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร BC_1F_1	110
16 การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร BC_1F_1	113
17 การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของต้น BC_1F_1 กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด.....	116
18 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC_1F_1	121
19 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC_1F_1	123

20	การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC_1F_1	125
21	การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC_1F_1	125
22	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายกับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร BC_1F_1	126
23	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายกับปริมาณแอนโทไซยานิน ในประชากร BC_1F_1	128
24	การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน	130
25	การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน	131
26	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC_1F_1	132
27	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร BC_1F_1	134
28	ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร BC_1F_1	137
29	ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร BC_1F_1	140
30	การคัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous (KP) จากประชากร BC_1F_1	143
31	เมล็ด BC_2F_1 ที่ได้จากการผสมกลับทั้งหมด 15 คู่ผสม	145
32	การวิเคราะห์ฟีโนไทป์ของต้นคัดเลือก BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้จำนวน 15 ต้น	149

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นอาหารหลักของประเทศไทย ปัจจุบันผู้บริโภคข้าวหันมาบริโภคข้าวที่ไม่ขัดสีโดยเฉพาะข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ ธาตุเหล็ก ลูทีน โพลีฟีนอล วิตามินบี และแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำส่วนใหญ่เป็นข้าวพื้นเมืองของไทย เช่น เหนียวดำ เหนียวกำ และมะลิดำ เป็นต้น (รัชนี้ และ ริญ, 2553)

แอนโทไซยานินเป็นสารสีที่พบในธรรมชาติจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งสูงกว่าวิตามินซีและอีถึง 2 เท่า (Bagchi et al., 1998; Cossins et al., 1998; Shi et al., 2003) ช่วยในการป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และโรคมะเร็ง (Geekiyana et al., 2012) แอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวชนิดหลัก คือ cyanidin 3-glucoside และชนิดรอง คือ peonidin 3-glucoside (Sompong et al., 2011) การสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวเกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มยีนควบคุม ประกอบด้วยยีนควบคุมที่มีรหัสของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด MYC แบบ bHLH ได้แก่ ยีน *OsB1* และ *OsB2* และยีนควบคุมที่มีรหัสของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด MYB แบบ R2-R3 Myb ได้แก่ ยีน *OsC1* และ *OsMYB3* และอีกกลุ่มหนึ่ง คือ ยีนโครงสร้างที่มีรหัสสร้างเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่สำคัญ คือ ยีน *OsDFR* (dihydroflavonol 4-reductase) โดยยีนควบคุมกลุ่ม MYC และ MYB จะทำหน้าที่ร่วมกันและกระตุ้นยีนโครงสร้างให้ทำงานเพื่อสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Furukawa et al., 2007; Nagao and Takahashi, 1963; Saitoh et al., 2004; Sakamoto et al., 2001)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เป็นการคัดเลือกจากยีนหรือจีโนไทป์ของลักษณะที่ต้องการได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพ ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ข้าววิธีนี้ไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง และไม่จำเป็นต้องรอทดสอบจากฟีโนไทป์เหมือนการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม ทำให้่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว และสามารถที่จะคัดเลือกข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต

ก่อนหน้านี้มีการศึกษาการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ หรือ SSR (simple sequence repeat) ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดต่างกันแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR แยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสี และใช้จำแนกข้าวที่เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ รวมทั้งการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Bounphanousay et al., 2008; Eizenga et al., 2017; Maeda et al., 2014; Pusadee et al., 2019; Shao et al., 2011; Vilayheuang et al., 2016)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 4, 4, 3 และ 1 ตามลำดับ ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว มาใช้ในการตรวจสอบข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างข้าวขาวและข้าวดำได้ และนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้ไปตรวจสอบในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ที่มาจากคู่ผสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์รับพุ่มธานี 1 กับข้าวพื้นเมืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์ให้ก้าน้อย เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกประชากรผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จะสามารถช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพื้นเมืองโดยวิธีผสมกลับ คัดเลือกได้อย่างแม่นยำในระยะเวลาอันสั้น เพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาและหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ที่ควบคุมและเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว
2. เพื่อตรวจสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่แยกความแตกต่างระหว่าง ข้าวขาวพันธุ์รับ และข้าวดำพันธุ์ให้
3. เพื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ประชากรชั่วที่ 2 (F_2) และประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ชั่วที่ 1 (BC_1F_1)
4. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) และประชากรผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่สัมพันธ์กับลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ปริมาณแอนโทไซยานิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
2. สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในการคัดเลือกสีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโตได้อย่างแม่นยำ และมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

แหล่งกำเนิดและชนิดของข้าว

ข้าวเป็นพืชล้มลุกจัดอยู่ในตระกูลหญ้า (Family: Gramineae หรือ Poaceae) เป็นธัญพืชสกุลออไรซา (Genus: *Oryza*) ข้าวมีจำนวนสายพันธุ์มากกว่า 120,000 พันธุ์ แพร่กระจายอยู่ทั่วโลก ตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 53 องศาเหนือ ถึง 35 องศาใต้ และสามารถเจริญเติบโตได้ดีตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับพื้นที่สูงประมาณ 3,000 เมตร ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ข้าวที่ค้นพบในท้องที่ต่าง ๆ ทั่วโลก แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มข้าวปลูกเพื่อบริโภค 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มข้าวปลูกเอเชีย ออไรซาซาไทวา (*Oryza sativa* Linn.) และกลุ่มข้าวปลูกแอฟริกา ออไรซาเกลเบอร์ริมา (*Oryza glaberrima* Steud.) ข้าวทั้งสองกลุ่มนี้มีโครโมโซม 2 ชุด (diploid, $2n = 24$) อีกกลุ่มหนึ่ง คือ ข้าวป่าที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมาก ข้าวปลูกที่บริโภคในปัจจุบันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในธรรมชาติของข้าวป่า ผ่านการคัดเลือกโดยธรรมชาติและมนุษย์ ข้าวมีความสำคัญต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก เนื่องจากประชากรกว่าครึ่งโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย มีการเพาะปลูกและบริโภคข้าวประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ประเทศต่าง ๆ ในทุกทวีปมากกว่า 100 ประเทศ สามารถปลูกข้าวเพื่อบริโภคได้ ข้าวปลูกเอเชียที่ปลูกทั่วไป แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

ข้าวชนิดที่ 1 คือ อินดิกา (indica) มีลักษณะใบกว้างสีเขียวอ่อน ลำต้นอ่อนและสูง แตกกอมาก เมล็ดยาวและค่อนข้างแบน ขนเมล็ดสั้นและมีจำนวนน้อย ส่วนใหญ่ไม่มีหาง และเมล็ดร่วงง่าย ปลูกมากในประเทศที่มีภูมิอากาศเขตร้อน ได้แก่ ศรีลังกา จีน อินเดีย อินโดนีเซีย บังกลาเทศ ไทย และฟิลิปปินส์

ข้าวชนิดที่ 2 คือ จาปอนิกา (japonica) มีลักษณะใบแคบสีเขียวเข้ม ลำต้นแข็งและเตี้ย แตกกอปานกลาง เมล็ดสั้นและค่อนข้างกลม ขนเมล็ดยาวและมีจำนวนมาก ไม่มีหางจนถึงหางยาว และเมล็ดร่วงยาก ปลูกมากในประเทศที่มีภูมิอากาศเขตอบอุ่น ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น และเกาหลี

ข้าวชนิดที่ 3 คือ จาวานิกา (javanica) มีลักษณะใบกว้างสีเขียวอ่อน ลำต้นแข็งและสูง แตกกอน้อย เมล็ดกว้างและหนา ขนเมล็ดยาว ไม่มีหางจนถึงหางยาว และเมล็ดร่วงยาก ปลูกมากในประเทศอินโดนีเซีย ต่อมาแพร่กระจายไปยัง ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และญี่ปุ่น (สงกรานต์, 2527; อรอนงค์, 2560)

ลักษณะการเจริญเติบโตของข้าว

ลักษณะที่สำคัญของข้าวแบ่งออกตามการเจริญเติบโต คือ ลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative grown phase) และลักษณะการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์ (reproductive growth phase) (บุญหงส์, 2557 และ อรอนงค์, 2560) ดังนี้

1. ลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้น เริ่มตั้งแต่ต้นข้าวงอกจากเมล็ดไปจนถึงวันที่สร้างช่อดอก ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ (ภาพที่ 1a)

ราก (root) ทำหน้าที่ยึดลำต้นกับดิน ดูดน้ำและแร่ธาตุที่ละลายในดิน ลำเลียงไปยังส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว โดยรากข้าวเป็นระบบรากฝอยแตกแขนงกระจายอยู่ใต้ผิวดิน ประกอบด้วยราก 2 ชนิด ได้แก่ รากชุดแรกเกิดที่งอกออกมาจากส่วนเรติคูล เป็นรากชั่วคราว รองรับส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวทำให้ทรงตัวอยู่ได้ และรากเสริมจะงอกออกมาบริเวณข้อล่างใต้ดินของลำต้นใหม่ มีการแตกแขนงของรากอย่างอิสระ นอกจากนี้ยังมีรากเสริมค้ำจุนที่เกิดบริเวณส่วนปลายของลำต้นอีกด้วย

ลำต้น (culm) ทำหน้าที่พยุงใบ ดอก และรวง โดยเฉพาะให้ใบชูออกรับแสงแดด ลำต้นของข้าวเกิดจากชุดของข้อ และปล้องที่ต่อเรียงสลับกัน มีลักษณะทรงกลม ตั้งตรงและเป็นโพรงตรงกลาง ซึ่งแบ่งออกเป็นปล้อง ๆ โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้อง ความยาวของปล้องนั้นแตกต่างกัน จำนวนปล้องจะเท่ากับจำนวนใบของต้นข้าว ปกติมีประมาณ 20-25 ปล้อง บริเวณข้อจะเป็นที่เกิดของใบและตา ข้อละหนึ่งตา สีของข้อก็แตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์ข้าว ซึ่งอาจจะมีสีเหลืองหรือสีม่วง

ใบ (leaf) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง การคายน้ำ และการหายใจ ใบข้าวเป็นใบแท้ ชนิดใบเดี่ยว มีลักษณะเป็นแผ่นยาวแบนและบาง ประกอบด้วย ตัวใบ กาบใบ ข้อต่อใบ หูใบหรือเยื่อกันน้ำฝน และเขี้ยวกันแมลง พันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์จะมีความยาว ความกว้าง รูปร่าง สีของใบ ตลอดจนการงอกของใบกับลำต้นไม่เหมือนกัน ใบที่อยู่ติดกับรวงข้าวเรียกว่า ใบธง บริเวณข้อต่อของใบมีเยื่อกันน้ำฝนและเขี้ยวกันแมลงติดอยู่ เขี้ยวกันแมลงและเยื่อกันน้ำฝนมีขนาดและสีแตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์ข้าว

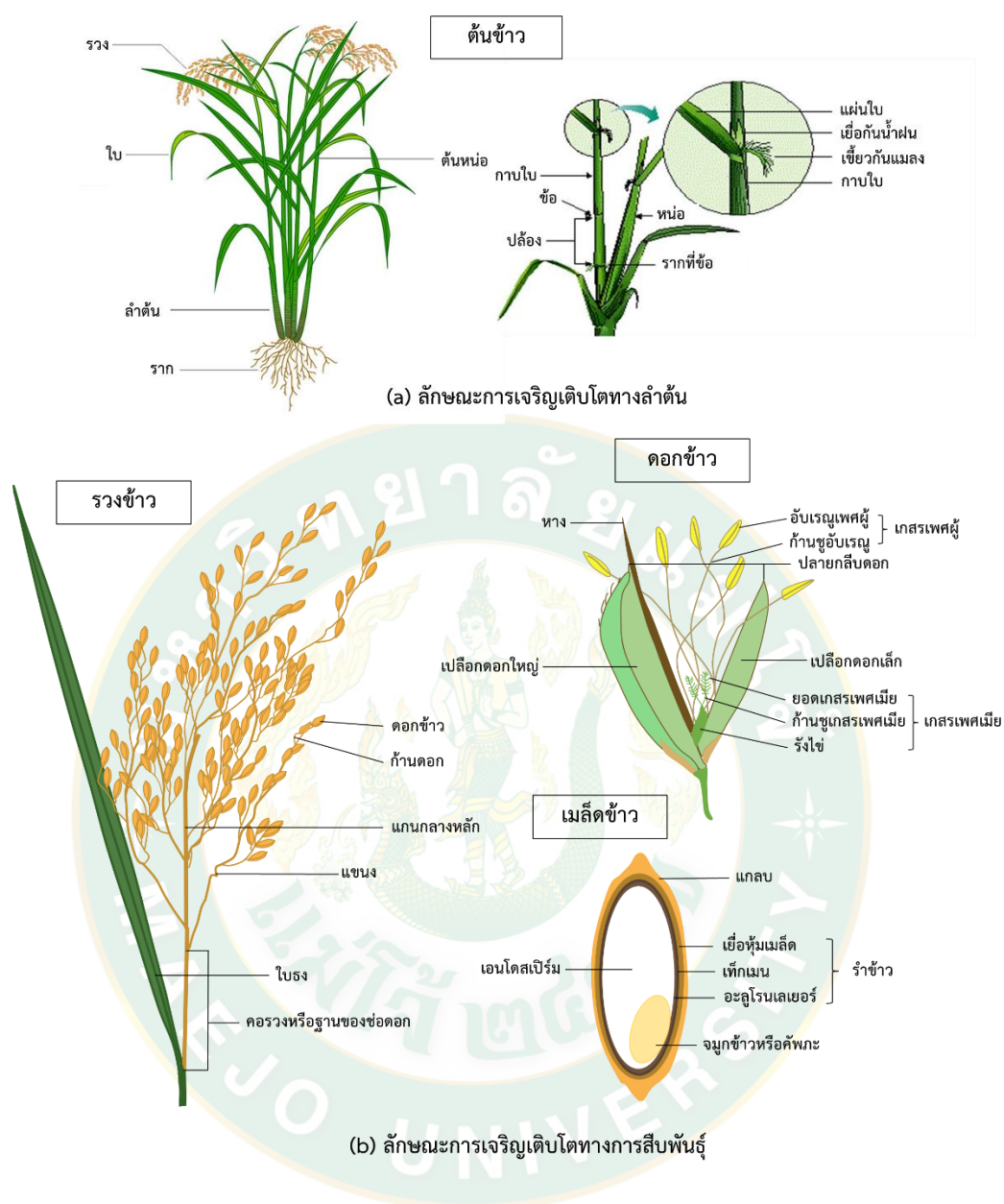
2. ลักษณะการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์ เริ่มตั้งแต่วันที่ต้นข้าวสร้างดอกอ่อน จนถึงวันที่รวงเริ่มโผล่จากใบธง ได้แก่ รวงข้าว ดอกข้าว และเมล็ดข้าว (ภาพที่ 1b)

ช่อดอกหรือรวงข้าว (inflorescence or panicle) เกิดขึ้นที่ข้อของปล้องสุดท้ายของต้นข้าว ระยะระหว่างข้อบนของปล้องสุดท้ายกับข้อต่อของใบธงเรียกว่า คอรวงหรือฐานของช่อดอก รวงข้าวประกอบด้วย แขนงดอกข้าว แขนงอันแรกของช่อดอกเริ่มจากข้อด้านบนของคอรวง แขนงต่อไปจะเกิดจากแกนกลางของรวง ไปจนถึงปลายรวง บนแขนงจะแตกกิ่งเล็ก ซึ่งแต่ละกิ่งจะมีดอกข้าว ลักษณะของรวงข้าว เช่น ความยาว รูปร่าง ความถี่ห่างของข้อของแขนงหรือระแนง

ตลอดถึงมุมของการแตกแขนงออกไปเป็นแขนงที่หนึ่งและแขนงที่สองจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์ข้าว การมีข้อของแขนงถื่นั้นเรียกว่า ระแงะถี่ ทำให้มีจำนวนดอกต่อรวงมากซึ่งเป็นลักษณะของพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูง

ดอกข้าว (spikelet) ประกอบด้วย ชั่วดอก (rachilla) กลีบรองดอก (sterile lemmas) เปลือกดอกใหญ่ (lemma) และเปลือกดอกเล็ก (palea) ประสานกันทำหน้าที่ป้องกันและห่อหุ้มส่วนที่อยู่ภายในไว้ อาจมีขนหรือไม่มีขนแตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์ข้าว ที่ปลายสุดของเปลือกดอกใหญ่ในข้าวบางพันธุ์จะมีลักษณะเป็นปลายแหลมยื่นออกมาเรียกว่า หาง (awn) ดอกข้าวเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) คือ มีทั้งเกสรเพศผู้ (stamen) และเกสรเพศเมีย (pistil) ที่อยู่ภายในเปลือกดอกเดียวกัน เกสรเพศผู้ มีอับเรณูเพศผู้ (anther) จำนวน 6 อัน อยู่บนก้านชูอับเรณู ภายในมีละอองเรณูขนาดเล็กจำนวนมาก ส่วนเกสรเพศเมียมีที่รับละอองเรณู (stigma) จากเกสรเพศผู้ มีลักษณะคล้ายหางกระรอกขนาดเล็กจำนวนสองอันและแต่ละอันมีก้านเชื่อมติดอยู่กับรังไข่

เมล็ดข้าว (seed) ถูกห่อหุ้มไว้ด้วยเปลือกข้าว เมื่อแกะเปลือกของเมล็ดข้าวออกจะได้เมล็ดข้าวที่เรียกว่า ข้าวกล้อง (brown rice) (ภาพที่ 1b) ซึ่งมีสีแตกต่างกันไปตามชนิดพันธุ์ของข้าว เมล็ดข้าวหรือข้าวกล้องประกอบด้วยส่วนที่เป็นแป้งที่เรียกว่า เอนโดสเปิร์ม (endosperm) และส่วนที่เป็นคัพภะ เยื่อบางชั้นนอกของเมล็ดข้าว เรียกว่า เยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp layers) เยื่อบางชั้นกลาง เรียกว่า เท็กเมน (tegmen) และเยื่อชั้นในสุด เรียกว่า อะลูโรนเลเยอร์ (aleurone layer) สีของข้าวกล้องจะเหมือนกับสีของเยื่อหุ้มเมล็ด ส่วนภายในที่เป็นแป้งจะมีลักษณะสีขาวหรือใส ข้าวเหนียวจะมีแป้งเป็นสีขาวขุ่น ส่วนข้าวเจ้ามีแป้งที่ใสกว่า โดยบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวประกอบด้วยสารอาหารอยู่จำนวนมาก



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของข้าว a) ลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้น และ
b) ลักษณะการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bardenas (1965) และ Wamaedeesa (2016)

ข้าวไทย

ประเทศไทยปลูกข้าวมานานตั้งแต่ยุคก่อนประวัติศาสตร์ จากหลักฐานการขุดพบรอยแกลบในเศษภาชนะดินเผา หมูบ้านโนนนกทา จังหวัดขอนแก่น และบ้านเชียง จังหวัดอุดรธานี และการขุดพบเมล็ดข้าวในถ้ำปุงสูง จังหวัดแม่ฮ่องสอน คาดว่ามีอายุประมาณ 5,500 ปี นอกจากนี้ยังมีการพบร่องรอยของชิ้นส่วนข้าวในถ้ำไกล่ซ้ายแดนพม่า อายุประมาณ 12,000 ปี เนื่องจากภูมิประเทศของประเทศไทยมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของทั้งข้าวปลูกและข้าวป่า ทำให้ข้าวป่ามีการแพร่กระจายทั่วประเทศถึง 5 ชนิด ในจำนวนนี้มีชนิดที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชีย คือ ข้าวป่าข้ามปี (*Oryza rufipogon* Griff.) และข้าวป่าปีเดียว (*Oryza nivara* Sharma et Shastri) ตลอดจนเป็นแหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวปลูกอีกด้วย ปัจจุบันสถาบันวิจัยข้าวได้รวบรวมพันธุ์ข้าวปลูก ข้าวป่า และข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยไว้มากกว่า 19,000 ตัวอย่าง จากความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในข้าวป่าที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูก ตลอดจนความหลากหลายของพันธุกรรมข้าวปลูกจำนวนมากในประเทศไทย จึงเป็นที่ยอมรับว่าประเทศไทยเป็นหนึ่งในศูนย์กำเนิดและแพร่กระจายของข้าวในทวีปเอเชีย (สงกรานต์, 2532)

ลักษณะพันธุ์ข้าวไทย (สุดยอดข้าวไทย, 2562) พันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูกในหลายพื้นที่นั้นมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกันไป การปลูกข้าวของเกษตรกรเป็นไปตามสภาพภูมิศาสตร์ วัฒนธรรม วิถีชีวิต เศรษฐกิจ และสังคมในพื้นที่นั้น ๆ พันธุ์ข้าวที่มีอยู่โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

1. พันธุ์ข้าวโบราณ (primitive types) พันธุ์ข้าวเหล่านี้ยังมีลักษณะดั้งเดิมอยู่ เช่น มีหาง ร่วงง่าย ระยะเวลาพักตัวยาว มีรากที่ข้อหรือมีลักษณะที่พบได้บ่อย เช่น ด้านทานต่อแมลง ทนแล้ง ทนน้ำท่วม หรือมีความสามารถดูดธาตุอาหารสูง พันธุ์ข้าวเหล่านี้ส่วนมากพบในบริเวณที่มีข้าวป่าหรือวัชพืชที่เกี่ยวข้อง (weed race) ขึ้นอยู่ เช่น พันธุ์ข้าวปึก และพันธุ์เปี้ยวเตี้ย
2. พันธุ์ข้าวลักษณะพิเศษ (specialty types) พันธุ์ข้าวปลูกที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ส่วนมากมีลักษณะเฉพาะ เช่น ด้านทานโรค ด้านทานแมลง ทนอากาศหนาวหรือทนดินที่มีปัญหา ทำให้พันธุ์ข้าวเหล่านี้ยังคงอยู่ในความนิยมของเกษตรกร แต่อาจมีเมล็ดสั้นหรือคุณภาพไม่เป็นที่นิยมของตลาด เช่น พันธุ์ชี้ช้าง และหางยีประดู่แดง
3. พันธุ์ข้าวที่เลิกปลูกแล้ว (obsolete types) พันธุ์ข้าวเหล่านี้แต่ก่อนอาจเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง แต่ในปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมปลูกและอาจสูญพันธุ์ไปแล้ว เช่น พันธุ์นอนทุ่ง และขาวจำปี
4. พันธุ์ข้าวที่ปลูกเฉพาะถิ่น (minor varieties) กลุ่มนี้เป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แต่มีปลูกมากในบางท้องถิ่น พันธุ์ข้าวเหล่านี้ยังมีความผันแปรมาก เกษตรกรอาจปลูกไว้ตามความต้องการ เนื่องจากมีอายุในการเก็บเกี่ยวเหมาะสม คุณภาพเมล็ดดีหรือทนทานต่อสภาพแวดล้อม เช่น พันธุ์กำดำ มันวัว และข้าวนก

5. พันธุ์ข้าวที่ปลูกเป็นการค้า (commercial varieties) โดยทั่วไปแล้วข้าวกลุ่มนี้เป็นข้าวพันธุ์ดีผ่านการคัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์มาแล้ว มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี คุณภาพเมล็ดดีอาจเหมาะกับตลาดภายในและต่างประเทศ จึงมีการปลูกกันอย่างกว้างขวาง เช่น พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เหลืองประทิว 123 และนางมลเอส 4

6. พันธุ์ข้าวให้ผลผลิตสูง (high-yielding varieties) พันธุ์ข้าวกลุ่มนี้เป็นผลจากการปรับปรุงพันธุ์ ได้พันธุ์ข้าวที่มีพันธุ์กรรมต้นเตี้ยหรือสูงปานกลาง ทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตได้ เช่น พันธุ์ กข 1 กข 21 กข 23 และสุพรรณบุรี 60

ข้าวพื้นเมืองของไทย

ข้าวพื้นเมืองจัดเป็นกลุ่มพันธุ์ข้าวที่ปลูกเฉพาะถิ่น (minor varieties) ที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีทางการเกษตร แต่มีการเพาะปลูกมากในบางท้องถิ่น พันธุ์ข้าวเหล่านี้ยังมีความผันแปรทางพันธุกรรมมาก เกษตรกรอาจปลูกไว้ เนื่องจากคุณภาพเมล็ดดี ทนทานต่อสภาพแวดล้อม และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อย่างไรก็ตามข้าวพื้นเมืองของไทยที่พบในแหล่งปลูกข้าวของแต่ละท้องถิ่น หลายพันธุ์มีชื่อที่เหมือนกัน ซึ่งอาจจะเป็นพันธุ์เดียวกันหรือต่างพันธุ์กันก็ได้ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองยังคงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่มาก และยังคงมีความสำคัญต่อการปลูกข้าวในพื้นที่สูงทั้งที่ปลูกในนาและปลูกแบบข้าวไร่ เนื่องจากได้รับความนิยมของผู้บริโภคและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่น ข้าวพันธุ์สังข์หยดของจังหวัดพัทลุง ข้าวไร่ก่ำจากพื้นที่สูงจังหวัดน่าน ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองขึ้นอยู่กับกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ การอนุรักษ์ และการกระจายของเชื้อพันธุ์ข้าวในแต่ละท้องถิ่น เชื้อพันธุ์ข้าวพื้นเมืองบางพันธุ์อาจจะสูญพันธุ์ไปเนื่องจากไม่มีความสำคัญต่อเกษตรกร

บริเวณพื้นที่สูงของประเทศไทยเป็นแหล่งของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีความหลากหลาย การสำรวจพื้นที่สูงในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน ในปี พ.ศ. 2516 พบพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีความแตกต่างในคุณภาพเมล็ด ประกอบด้วยปริมาณธาตุเหล็ก ธาตุสังกะสี และคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Jamjod et al., 2017) นอกจากนี้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองส่วนใหญ่มีธาตุเหล็กสูงกว่าข้าวพันธุ์ปลูกบริเวณพื้นที่ราบ ชี้ให้เห็นถึงประโยชน์โดยตรงต่อผู้บริโภคข้าวที่ปลูกในท้องถิ่น ซึ่งอาจนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปได้ (เบญจวรรณ, 2561) การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของข้าวพื้นเมืองของจังหวัดยโสธร พบว่า ข้าวพันธุ์พื้นเมืองเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญ มีคุณค่าทางด้านโภชนาการสูง ค่าดัชนีน้ำตาลต่ำ โดยมีปริมาณสารสำคัญที่จำเป็นต่อร่างกายที่มีอยู่ในพันธุ์พื้นเมืองต่าง ๆ เช่น ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ก่ำใหญ่และกำน้อยมีปริมาณลูทีนสูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีปริมาณธาตุเหล็กแตกต่างกันมากในข้าวพื้นเมืองแต่ละพันธุ์ แต่สังกะสีและทองแดงมีปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนโฟเลตมี

ปริมาณสูงที่สุดในข้าวพันธุ์เจ้าเหลือง และพันธุ์มะลิดำยังมีวิตามินอีสูงอีกด้วย นอกจากนี้ พบว่าพันธุ์พื้นเมืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มถึงดำจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และอาจช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่าง ๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ เป็นต้น โดยโรคเหล่านี้อาจเกิดขึ้นจากการได้รับอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน (รัชนิ และ ริญ, 2553)

ดังนั้น การบริโภคข้าวและการเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ทั้งด้านคุณภาพและปริมาณจะส่งผลดีต่อสุขภาพ อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยป้องกันโรคต่าง ๆ และช่วยให้ผู้บริโภคมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นได้ ถ้านำข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหล่านี้มาปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตสูง มีคุณลักษณะที่ดีทางการเกษตร เช่น ไม่ไวต่อช่วงแสง ปริมาณเมล็ดต่อรวงมาก และมีคุณภาพการหุงต้มดี ก็จะช่วยทำให้ข้าวพื้นเมืองเป็นที่นิยมต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้ข้าวไทยได้อีกด้วย

คุณค่าทางโภชนาการของข้าว

ข้าวโภชนาการสูง (high nutrition rice) คือ ข้าวที่มีคุณค่าทางอาหารในปริมาณสูงกว่าข้าวทั่วไป มีสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น สารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยชะลอการเสื่อมของเซลล์ ลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง และช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ได้แก่ แอนโทไซยานิน โปรแอนโทไซยานินิน แกมมาโอไรซานอล วิตามินอีในกลุ่มโทโคฟีรอล ฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก นอกจากนี้ยังพบ ธาตุเหล็ก ธาตุสังกะสี และวิตามินบี 1 2 และ 3 โอเมก้า 3 6 และ 9 และสาร ASGs (acylated steryl glucosides) ข้าวโภชนาการสูงส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มข้าวสีหรือข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสี สารที่มีคุณค่าทางอาหารจะพบบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ได้แก่ ข้าวกล้องที่มีสีน้ำตาล แดง ม่วง เข้ม และดำ (กรมการข้าว, 2562)

ข้าวสี (color rice) คือ ข้าวกล้องที่แปรรูปมาจากข้าวเปลือกเจ้าหรือข้าวเปลือกเหนียว ซึ่งจะมีเยื่อหุ้มชั้นนอก (seed coat) หรือเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) สีเข้มหรือสีอ่อนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ พื้นที่เพาะปลูกและฤดูการผลิต มีคุณค่าทางโภชนาการตามสีและพันธุ์นั้น ๆ โดยอาจแบ่งกลุ่มตามสีของเยื่อหุ้มเมล็ด (กระทรวงพาณิชย์, 2562) ดังนี้

กลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงหรือสีดำ เช่น พันธุ์ข้าวเหนียวดำลิ้มผัว ข้าวเหนียวดำหอ้อย ข้าวดำ ข้าวหอมนิล ข้าวมะลินิลสุรินทร์ และข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นต้น จัดเป็นข้าวโภชนาการสูง มีรงควัตถุหรือสารสี ที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในน้ำมัน ได้แก่ แกมมา-โทโคไตรอีนอล แกมมา-ออไรซานอล และสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในน้ำ ได้แก่ แอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน ประโยชน์ของสารเหล่านี้จะช่วยลดไขมันอุดตันในเส้นเลือด บำรุงสายตา เป็นยาบำรุงโลหิต และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

กลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง เช่น พันธุ์ทับทิมชุมแพ สังข์หยด หอมมะลิแดง ทับทิมโกเมน หอมกุหลาบแดง และหอมกระดังงา เป็นต้น จัดเป็นข้าวโภชนาการสูง ลักษณะเด่น คือ มีสารต้านอนุมูลอิสระ ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สารโพลีฟีนอล และโปรแอนโทไซยานิดิน ประโยชน์ของสารเหล่านี้จะช่วยในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ต้านอนุมูลอิสระ ชะลอการเสื่อมของเซลล์ ช่วยการหมุนเวียนของกระแสโลหิต ลดอัตราเสี่ยงของการเป็นมะเร็ง ป้องกันโรคหัวใจ มี GABA สูง มีประโยชน์ต่อระบบประสาทและสมอง ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ มีกากใยอาหารสูง มีโปรตีนชะลอความแก่ มีธาตุเหล็ก และฟอสฟอรัส ช่วยบำรุงโลหิต ป้องกันโรคความจำเสื่อม

กลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีครีมหรือน้ำตาล เช่น พันธุ์กล้องลีนเหล็ก ข้าวฮาง เป็นต้น จัดเป็นข้าวโภชนาการสูง ลักษณะเด่น คือ มีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสูง เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ในอาซิน วิตามินอี แร่ธาตุ ฟอสฟอรัส แคลเซียม เหล็ก ทองแดง สังกะสี เป็นต้น ประโยชน์ของสารเหล่านี้จะช่วยในการดูดซึมธาตุเหล็ก ข้าวในกลุ่มนี้มีน้ำตาลต่ำ ลดภาวะการดื้อของอินซูลิน เพิ่มกระบวนการทำงานของตับอ่อน และเพิ่มปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าว

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ซึ่งโดยปกติภายในร่างกายจะมีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ ในกรณีที่ร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ จะทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดความสมดุล ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ร่างกายเสียหายได้ แหล่งของอนุมูลอิสระภายนอก ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนโตรไดออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น คิวบุนทรีย์ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา และแหล่งภายใน ได้แก่ อนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น ดังนั้นร่างกายจึงมีกลไกที่จะกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ 2 วิธี วิธีที่ 1 คือ การใช้เอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อจับกับอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD) และ catalase glutathione peroxidase เป็นต้น ส่วนวิธีที่ 2 คือ การได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร เช่น วิตามินอี เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) โปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) สารประกอบโพลีฟีนอลต่าง ๆ เช่น แทนนิน (tannin) แคททีชิน (catechin) เป็นต้น นอกจากนี้ยังรวมถึงโคเอนไซม์คิวเท็น (Coenzyme Q10) หรือโคคิวเท็น (Co Q10) ที่พบในน้ำมันรำข้าวสกัดเย็น ดังนั้น ข้าวจึงมีคุณค่าทางโภชนาการทั่วทั้งเมล็ด ทั้งส่วนของเนื้อข้าว รำข้าว หรือ เยื่อหุ้มเมล็ด และจมูกข้าว เพราะฉะนั้นการบริโภคข้าวให้ครบทุกส่วนของเมล็ด จะทำให้ห่างไกลจากโรคเรื้อรังต่าง ๆ อีกทั้งยังมีสุขภาพที่ดีขึ้นและมีอายุยืนยาวอีกด้วย (รัชณี และคณะ, 2557)

การทดสอบคุณค่าทางโภชนาการทางด้านสารต้านอนุมูลอิสระของข้าวโดยกรมการข้าว จำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่าในปี พ.ศ. 2559 ข้าวดอกข้า (จังหวัด พังงา) มีสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เท่ากับ 564 มิลลิกรัมต่อข้าว 100 กรัม ตามด้วย ข้าวเหนียวดำลิ้มผัว เท่ากับ 491 มิลลิกรัมต่อข้าว 100 กรัม และข้าวทับทิมชุมแพ เท่ากับ 308 มิลลิกรัมต่อข้าว 100 กรัม ตามลำดับ ถ้านำพันธุ์ข้าวที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมาเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวที่นิยมบริโภคของไทย เช่น ข้าวหอมมะลิ มีสารต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 37 มิลลิกรัมต่อข้าว 100 กรัม และข้าวไรซ์เบอร์รี่ เท่ากับ 186 มิลลิกรัมต่อข้าว 100 กรัม พบว่าข้าวทั้งสามสายพันธุ์ข้างต้น มีสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าข้าวหอมมะลิและข้าวไรซ์เบอร์รี่อย่างชัดเจน ดังนั้นคุณค่าของข้าวไทยโดยเฉพาะข้าวสี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง หากได้รับการปรับปรุงให้เป็นข้าวพันธุ์ดีก็จะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวไทยได้เป็นอย่างมาก (เดชรัตน์, 2560)

จากการตรวจเอกสารงานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าว พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสี เช่น ดำ หรือ แดง จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว โดยมีรายงานในงานวิจัยต่าง ๆ ดังนี้

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวในประเทศไทย จีน และศรีลังกา ประกอบด้วย ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง จำนวน 9 พันธุ์ และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ จำนวน 3 พันธุ์ ด้วยวิธี DPPH รายงานว่า กลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและดำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีทั้งสีแดงและดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว นอกจากนี้ พบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงจากประเทศศรีลังกามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (Sompong et al., 2011)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวไทยจำนวน 8 พันธุ์ ที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดต่างกัน ได้แก่ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวขาวตาแห้ง ข้าวเหลืองปะทิว ข้าวดอย ข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมนิล ข้าวสังข์หยด และข้าวหอมแดง ด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวแต่ละพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและดำจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ซึ่งพันธุ์ข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ ข้าวหอมแดง ตามด้วย ข้าวหอมนิล เหนียวดำ และสังข์หยด ตามลำดับ (นิพนธ์ และประมวล, 2561) สอดคล้องกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวไทย จำนวน 15 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ดำ และแดง อย่างละ 5 พันธุ์ ด้วยวิธี DPPH พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (Muntana and Prasong, 2010)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของข้าวไทยที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์พิษณุโลก 2 และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์เหนียวดำ และหอมนิล ด้วยวิธี DPPH พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว โดยข้าวพันธุ์เหนียวดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ตามด้วยข้าวพันธุ์หอมนิลและพิษณุโลก 2 ตามลำดับ (Sutharut and Sudarat, 2012)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ของข้าวประเทศอินโดนีเซีย ประกอบด้วย ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ดำ และแดง จำนวน 5 พันธุ์ พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและดำมีปริมาณฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว โดยพบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (Yuliana and Akhbar, 2020)

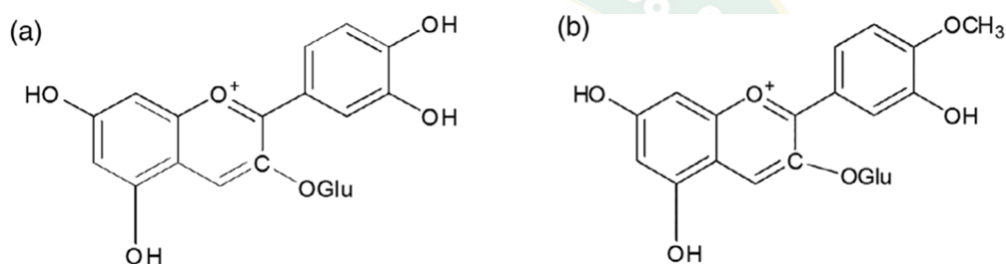
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวประเทศไต้หวัน ประกอบด้วยรำข้าวแดง และดำ ด้วยวิธี DPPH พบว่า รำข้าวแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ารำข้าวดำ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่ามีความสัมพันธ์สูงมากกับทั้งสองลักษณะอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังนั้น ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Huang and Lai, 2016)

ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) จากธรรมชาติอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenolic compounds) สร้างจากกรดอะมิโนที่มีวงแหวน (aromatic amino acids) ได้แก่ phenylalanine, tyrosine และ malonate ฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชส่วนใหญ่จับอยู่กับน้ำตาลในรูปเบต้าไกลโคไซด์ (β -glycosides) โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ประกอบด้วย คาร์บอน 15 ตัว (C6 - C3 - C6) จัดเรียงในระบบ 3 ring เรียกเป็น ring A, B, และ C โดย ring A และ B เป็นวงเบนซีน (benzene ring) ส่วน ring C เป็น heterocyclic pyran ring ฟลาโวนอยด์ ทำหน้าที่เป็นสารให้สีที่สำคัญในพืช พบได้ใน ผัก ผลไม้ ธัญพืช พืชตระกูลถั่ว เครื่องเทศ สมุนไพร ลำต้น กิ่งก้าน ดอก และเมล็ด สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้เป็น 7 กลุ่ม คือ 1. ฟลาโวน (flavones) 2. ฟลาโวนอล (flavonols) 3. ฟลาวาโนน (flavanones) 4. ฟลาวานอล (flavanols) 5. ฟลาวาโนนอล (flavanonols) 6. ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และ 7. แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) (วิกิพ, 2556)

แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (water-soluble pigments) จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารสีตามธรรมชาติ โดยสีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง มีโครงสร้างประกอบด้วย คาร์บอน 15 ตัว (C6 - C3 - C6) อยู่ในรูปไกลโคไซด์ (glycoside) แอนโทไซยานินมีหลายชนิดปัจจุบันมีการค้นพบมากกว่า 30 ชนิด แต่มีอยู่ 6 ชนิดเท่านั้นที่พบบ่อยในพืช ได้แก่ pelargonidin (Pg), cyanidin (Cy), delphinidin (Dp), peonidin (Pn), petunidin (Pt) และ malvidin (Mv) โดยแอนโทไซยานินชนิดที่พบในข้าว คือ cyanidin 3-glucoside ชนิดหลัก และ peonidin 3-glucoside ชนิดรอง (ภาพที่ 2) (Das et al., 2020; Sompong et al., 2011)



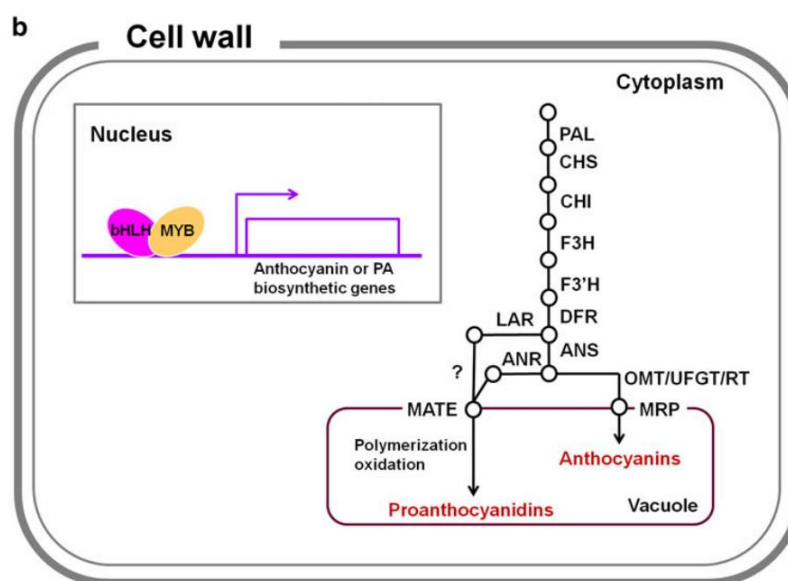
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ a) Cyanidin 3-glucoside และ b) Peonidin 3-glucoside ในข้าว

ที่มา: Das et al. (2020)

แอนโทไซยานินมีคุณสมบัติแตกต่างกันทั้งทางเภสัชวิทยาและชีววิทยา เช่น เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ช่วยต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดอาการอักเสบ โดยเพิ่มความแข็งแรงของเส้นใยโปรตีนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูกอ่อน จึงลดการทำลายจากอนุมูลอิสระอันตรายที่สำคัญ ได้แก่ DPPH[•], O₂^{•-}, OH[•], O₂ และ H₂O₂ (Peng et al., 2006) นอกจากนี้ช่วยปกป้องหลอดเลือด ลดคอเลสเตอรอลในเลือด ลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งและต้านไวรัส แต่คุณสมบัติเด่นที่สุดของแอนโทไซยานิน คือ ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant effectiveness) โดยแอนโทไซยานินมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซีและอีถึง 2 เท่า และปริมาณของแอนโทไซยานินที่มนุษย์สามารถบริโภคได้เฉลี่ยสูงสุด คือ 200 มิลลิกรัมต่อวัน (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

การสังเคราะห์แอนโทไซยานินเกี่ยวข้องกับยีน 2 กลุ่ม คือ ยีนโครงสร้าง และยีนควบคุม ในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินยีนควบคุมจะทำงานร่วมกับยีนโครงสร้างเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนอลอลานินไปเป็นแอนโทไซยานินที่มีสีม่วงแดง ยีนควบคุมสำคัญ ได้แก่ ยีนควบคุมที่เป็นรหัสของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ชนิด basic helix-loop-helix (bHLH) หรือ MYC และยีนควบคุมที่เป็นรหัสของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ชนิด R2-R3 Myb หรือ MYB ซึ่งจะไปกระตุ้นยีนโครงสร้างที่มีรหัสสร้างเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน โดยการทำงานร่วมกันของยีนควบคุมและยีนโครงสร้างจะทำให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว (Furukawa et al., 2007; Nagao and Takahashi, 1963; Saitoh et al., 2004; Sakamoto et al., 2001)



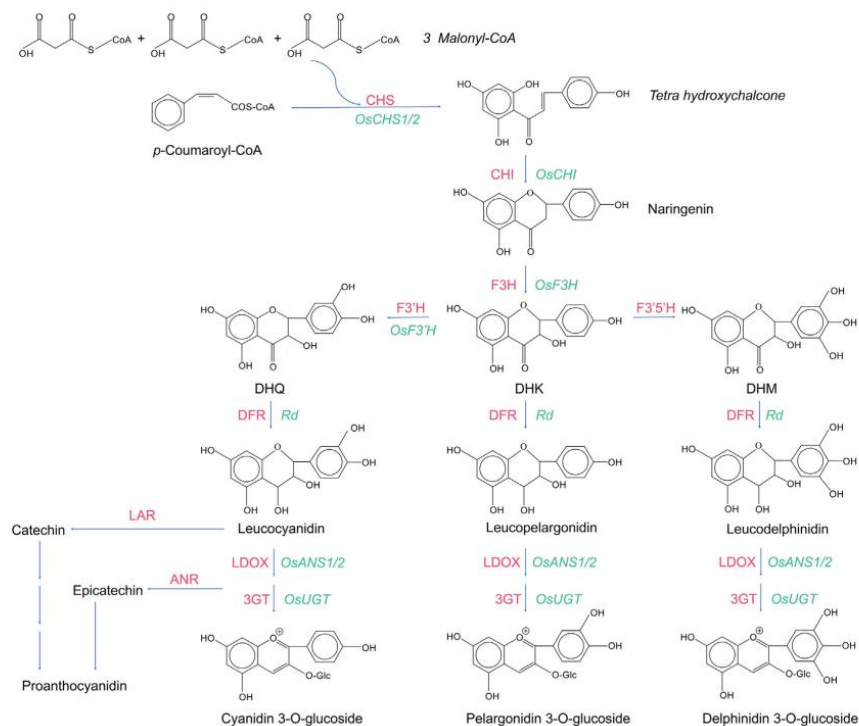
ภาพที่ 3 การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

ที่มา: Lim and Ha (2013)

ยีนโครงสร้าง

ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) หลายชนิดเพื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนอละลานินไปเป็นสารแอนโทไซยานิน ซึ่งยีนโครงสร้างจะมีรหัสสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Xia et al., 2021) ดังนี้ เริ่มจากสารตั้งต้น *p*-Coumaroyl-CoA ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยยีนสร้างเอนไซม์ chalcone synthase (*OsCHS1/2*) ตามด้วย chalcone isomerase (*OsCHI*), flavonoid 3'-hydroxylase (*OsF3H*), flavonoid 3'-hydroxylase (*OsF3'H*), dihydroflavonol 4'-reductase (*OsDFR/Rd*), anthocyanidin synthase (*OsANS*) และ flavonoid 3-glucosyl-transferase (*OsUGT*) (Mbanjo et al., 2020) (ภาพที่ 4) โดยยีนโครงสร้างเหล่านี้ถูกควบคุมโดยยีนควบคุมที่สำคัญในการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน

จากการตรวจสอบเอกสารงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ยีนโครงสร้างที่สำคัญในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิดิน คือ ยีน *OsDFR* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 เป็นยีนโครงสร้างที่มีรหัสสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol-4-reductase (DFR) เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน และแอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ประกอบด้วย 2 อินทรอน และ 3 เอกซอน พบการแทนที่เบส C เป็นเบส A ในข้าวขาว บริเวณเอกซอน 2 ทำให้เกิดรหัสหยุดก่อนกำหนด (Furukawa et al., 2007; Lim and Ha, 2013; Sweeney et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเกิดสีแดงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนโครงสร้าง *OsDFR* ที่ถูกกระตุ้นโดยยีนควบคุม *Rc* (Sweeney et al., 2006) และการเกิดเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงหรือดำ เกิดจากยีนโครงสร้าง *OsDFR* หรือ *Rd* ที่ถูกกระตุ้นโดยยีนควบคุม *OsB1* หรือ *Pb* (Lee et al., 2018; Rahman et al., 2016; Rahman et al., 2013) การศึกษาของ Maeda et al. (2014) พบว่า การทำงานของยีนโครงสร้าง *OsDFR* ที่ถูกกระตุ้นโดยยีนควบคุมทั้ง 2 กลุ่ม คือ ยีน *OsB2* กลุ่ม MYC และ ยีน *OsMYB3* กลุ่ม MYB ทำให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของยีน *OsDFR* เพียงยีนเดียวไม่สามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวได้



ภาพที่ 4 วิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

ที่มา: Xia et al. (2021)

ยีนควบคุม

ยีนควบคุม (regulatory gene) มีรหัสสร้างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ยีนควบคุมที่สำคัญมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีรหัสสร้างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด MYC มีบริเวณจับของดีเอ็นเอ (DNA binding domain) เป็นแบบ basic helix-loop-helix (bHLH) (Xia et al., 2021) และกลุ่มที่มีรหัสสร้างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด MYB ประกอบไปด้วย บริเวณซ้ำสองบริเวณ คือ R2 และ R3 ซึ่งมี DNA binding domain เป็นแบบ helix-turn-helix (HTH) (Saitoh et al., 2004; Zhou et al., 2008)

ยีนควบคุมชนิด MYC มีรหัสสร้างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด bHLH ที่มีบทบาทสำคัญสำหรับการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว คือ ยีน *OsB1* และ *OsB2* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 ของข้าว ยีน *OsB1* ประกอบด้วย 8 เอกซอน และ 7 อินทอน (Lim and Ha, 2013) เช่นเดียวกับยีน *OsB2* (Oikawa et al., 2015)

ก่อนหน้านี้มีการศึกษาใน *OsB1* ในข้าว พบว่า *OsB1* ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดงมีการแทรก (insertion) ของลำดับเบสในเอกซอนที่ 7 จำนวน 2 คู่เบส (2-bp GT addition) เป็นสาเหตุทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟท์ (Lim and Ha, 2013) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sakulsingharoj et al. (2016) และอนงค์นาฏ และคณะ (2562) พบการแทรกของลำดับเบสจำนวน 2 คู่เบสในข้าวไทยที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว แต่ไม่พบในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ยีน *OsB1* หรือ *Pb* เป็นยีนควบคุมหลักที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวมีสีม่วงหรือดำ (Lee et al., 2018; Rahman et al., 2016; Rahman et al., 2013) และการมีอัลลีลเด่นของยีน *OsB1* จำนวน 1 ตำแหน่ง จะทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวมีสีน้ำตาลหรือดำ (อนงค์นาฏ และคณะ 2564)

การศึกษาใน *OsB2* หรือ *Kala 4* พบว่า มีความคล้ายกับยีน *R/B* ในข้าวโพด (Hu et al., 1996; Sakamoto et al., 2001) และพบการแสดงออกของยีน *OsB2* เฉพาะในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (Inta et al., 2013; Shin et al., 2006) แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว (Inta et al., 2013; Sakulsingharoj et al., 2014; Shih et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ยีน *OsB2* เป็นยีนควบคุมสำคัญในการเกิดสีน้ำตาลหรือดำบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว (Saitoh et al., 2004)

ยีนควบคุมชนิด MYB มีรหัสสร้างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด R2-R3 ที่มีบทบาทสำคัญสำหรับการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว คือ ยีน *OsC1* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทرون (Chin et al., 2016) ส่วนยีน *OsMYB3* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 3 (Saitoh et al., 2004)

การศึกษาใน *OsC1* พบว่า มีความคล้ายกับยีน *C1* ในข้าวโพด (Martin and Paz-Ares, 1997; Reddy et al., 1995) ก่อนหน้านี้มีรายงานว่ายีน *OsC1* บริเวณเอกซอนที่ 3 มีการขาดหายไป (deletion) จำนวน 10 คู่เบส ใน R3 ของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและมีกาบใบสีเขียว (Chin et al., 2016; Choudhury et al., 2014; Rachasima et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ยีน *OsC1* เป็นยีนสำคัญที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณใบ กาบใบ ปลายกลีบดอกใหญ่ และยอดเกสรเพศเมีย โดยทำงานร่วมกับยีนในกลุ่ม MYC ทำให้กระตุ้นการทำงานของยีนโครงสร้าง (Chin et al., 2016; Hu et al., 2020; Zhao et al., 2016; Zheng et al., 2019)

การศึกษาใน *OsMYB3* หรือ *kala 3* พบว่า เป็นยีนควบคุมกลุ่มหนึ่งในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เมื่อทำงานร่วมกับยีนควบคุมกลุ่ม MYC คือ *OsB2* หรือ *kala 4* ทำให้กระตุ้นการทำงานของยีนโครงสร้าง *OsDFR* หรือ *kala1* เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดทำให้ข้าวมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ซึ่งการมีอัลลีลเฉพาะยีน *OsMYB3* ไม่สามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวได้ (Saitoh et al., 2004; Maeda et al., 2014)

ดังนั้น การเกิดสีดำบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ประกอบด้วย ยีน 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม MYC ได้แก่ ยีน *OsB1* และ *OsB2* กลุ่ม MYB ได้แก่ ยีน *OsMYB3* และยีนโครงสร้าง คือ *OsDFR* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวจำเป็นต้องมีการทำงานของยีน 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม P, C และ A โดยการทำงานร่วมกันของยีนกลุ่ม MYC (P คือ Tissue specific regulator gene) และ MYB (C คือ Chromogen gene) เพื่อไปกระตุ้นยีนโครงสร้าง (A คือ Activator gene) ทำให้ข้าวเกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณต่าง ๆ (Nagao and Takahashi, 1963; Saitoh et al., 2004)

การวิวัฒนาการของยีนต้นกำเนิดข้าวดำ

ข้าวดำเป็นข้าวชนิดหนึ่งของสายพันธุ์ *Oryza sativa* L. เป็นที่รู้จักกันในหลายชื่อ ได้แก่ ข้าวม่วง (purple rice) ข้าวต้องห้าม (forbidden rice) ข้าวสวรรค์ (heaven rice) ข้าวจักรพรรดิ (imperial rice) และข้าวอายุยืน (long life rice) เป็นต้น (Kushwaha, 2016) มีประวัติการเพาะปลูกข้าวดำมายาวนานในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น จีน อินเดีย และไทย (Kong et al., 2008) พันธุ์ข้าวดำพบมากกว่า 200 ชนิด ทั่วโลก ประเทศจีนผลิตสูงที่สุดถึง 148.87 ล้านเมตริกตัน รองลงมา คือ อินเดีย อินโดนีเซีย บังกลาเทศ และเวียดนาม ส่วนประเทศไทยครองอันดับที่ 6 ตามด้วย เมียนมาร์ และฟิลิปปินส์ (Agrawal, 2021; Ichikawa et al., 2001) แหล่งกำเนิดและการเพาะปลูกข้าวดำเกิดจากการวิวัฒนาการในระหว่างกระบวนการเพาะปลูกของข้าว จากข้าวป่า *Oryza rufipogon* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ยีนควบคุมสำคัญบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง คือ ยีน *Rc* มีรหัสสร้างทรานสคริปชันแฟคเตอร์ชนิด basic-helix-loop-helix (bHLH) การเกิดความบกพร่องของอัลลีล *Rc* ทำให้ข้าวปลูกส่วนใหญ่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว

ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่กระจายอยู่หลายพื้นที่ทั่วเอเชียเกิดจากการแสดงออกของยีนควบคุมสำคัญ คือ ยีน *Kala4* หรือ *OsB2* (Os04g0557500) มีรหัสสร้างทรานสคริปชันแฟคเตอร์ชนิด basic-helix-loop-helix (bHLH) คล้ายกับยีน *R/B* ของข้าวโพดที่เคยรายงานว่าเป็นยีน *OsB2* (Sakamoto et al., 2001) นอกจากนี้มีรายงานว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีต้นกำเนิดมาจากข้าวป่า *Oryza rufipogon* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง โดยเกิดขึ้นจากการจัดเรียงตัวใหม่ของยีน *Kala4* (rearrangement) บริเวณโปรโมเตอร์ โดยมีการแทรก (insertion) จาก 83 kb upstream ที่บริเวณโปรโมเตอร์ จำนวน 3 แบบ คือ แทรกขนาด 11.02, 8.32 และ 5.91 กิโลเบส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเกิดการจำลองตัวเอง (duplication) ขนาด 4,679 คู่เบส จากเอกซอน 1 อินทรอน 1 เอกซอน 2 และอินทรอน 2 บางส่วน ที่บริเวณโปรโมเตอร์ด้วย อย่างไรก็ตามไม่พบการจัดเรียงตัวใหม่ของยีน *Kala4* ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณโปรโมเตอร์ในยีน

Kala4 และการจัดเรียงตัวใหม่ ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน bHLH และกระตุ้นวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ส่งผลให้เกิดข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (Oikawa et al., 2015)

จากการศึกษาของ Oikawa et al. (2015) รายงานว่า ข้าวดำชนิดแรกเกิดขึ้นในข้าวชนิดจาปอนิกาเขตร้อน (tropical japonica) จากนั้นจึงแพร่กระจายไปยังข้าวชนิดอินดิกา (indica subspecies) ในเวลาต่อมา อาจเกิดขึ้นโดยการผสมข้ามสายพันธุ์ตามธรรมชาติหลายครั้งในช่วงวิวัฒนาการของข้าว และเกิดกระบวนการ refined introgression ซึ่งลักษณะสีดำของเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ได้มาจากการรวมกันใหม่ของยีนในระหว่าง หรือ หลังกระบวนการเพาะปลูกข้าว เนื่องจากพบการทำงานของยีน *kala4* ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ทั้งชนิดจาปอนิกาและอินดิกา แต่ไม่พบใน accessions ของข้าวป่าพันธุ์ *Oryza rufipogon* ที่เป็นต้นกำเนิดของข้าวดำ จากการศึกษาคู่มือโครงสร้างบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *kala4* ในข้าวดำพื้นเมือง จำนวน 21 พันธุ์ พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณดังกล่าว ดังนั้น มีความเป็นไปได้ว่าข้าวดำเกิดจากการวิวัฒนาการมาจากข้าวแดง จากนั้นเกิดการแพร่กระจายไปยังสายพันธุ์อื่น โดยมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและดีเอ็นเอบางอย่าง

จากการศึกษาของ Roy and Shil (2020) พบว่า ข้าวดำชนิดอินดิกาของประเทศอินเดีย เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง ข้าวป่า *Oryza rufipogon* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง กับข้าวชนิดอินดิกาพันธุ์พื้นเมืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว คือ Badshabhog และพันธุ์พื้นเมืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง คือ Chenga แต่ไม่พบในข้าวพันธุ์ปรับปรุง Ranjit โดยพบว่าลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำเกิดขึ้นในลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 progeny) นอกจากนี้ลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำได้กระจายไปยังชั่วที่ 3, 4 และ 5 (F_3 - F_4 - F_5 progeny) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวดำที่เกิดขึ้นยังคงได้รับการถ่ายทอดและคงไว้ในประชากร ดังนั้น ข้าวดำในประเทศอินเดียมีต้นกำเนิดมาจากการผสมข้ามพันธุ์ตามธรรมชาติ และการคัดเลือกในระหว่างขั้นตอนการเพาะปลูก สอดคล้องกับการศึกษาของ Oikawa et al. (2015) ที่รายงานไว้ว่า ข้าวดำกำเนิดมาจากข้าวป่าพันธุ์ *Oryza rufipogon* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง โดยเกิดการจัดเรียงตัวใหม่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *Kala4* และเกิดการแทรกขึ้นส่วนขนาด 11.02 คู่เบส จากบริเวณ 83 kb upstream บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *Kala4*

จากการศึกษาของ Oikawa et al. (2015) ที่รายงานไว้ว่า ข้าวดำชนิดแรก คือ ข้าวชนิดจาปอนิกาเขตร้อนแล้วกระจายไปยังข้าวชนิดอินดิกา แต่อย่างไรก็ตาม ข้าวชนิดจาปอนิกาเขตร้อนไม่ได้เป็นเพียงแหล่งเดียวของวิวัฒนาการของยีน *Kala4* และการพัฒนาของข้าวดำ เนื่องจากรายงานของ Roy and Shil (2020) พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำชนิดอินดิกาเกิดขึ้นจากการผสมข้ามระหว่างข้าวป่าพันธุ์ *Oryza rufipogon* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงกับข้าวชนิดอินดิกาที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดง

การวิเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง (ดำ) และขาว ด้วยวิธี pH differential พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินจะสะสมอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง แต่ไม่พบในเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว นอกจากนี้ พบว่า ลูกผสมในประชากรชั่วที่ 2 (F_2) ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ไม่พบปริมาณแอนโทไซยานิน ในขณะที่ต้น F_2 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลและม่วงมีการกระจายของปริมาณแอนโทไซยานินเป็นแบบต่อเนื่อง โดยส่วนใหญ่มีค่าน้อย ซึ่งต้น F_2 ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงส่วนใหญ่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและน้ำตาลเข้ม (Mapan et al., 2014)

มีหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ แดง และขาว ด้วยวิธี pH differential พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินพบเฉพาะข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำทุกพันธุ์ที่ทดสอบ แต่ไม่พบในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง และขาว นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์ปริมาณโปรแอนโทไซยานิน พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีโปรแอนโทไซยานินจำนวนมากในทุกพันธุ์ที่ทดสอบ แต่ไม่พบในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ (Jiamyangyuen et al., 2017; Hosoda et al., 2018; Finocchiaro et al., 2010) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าพบข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำบางพันธุ์ที่มีปริมาณโปรแอนโทไซยานินสะสมอยู่ด้วย และจากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังพบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่มีทั้งแอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน สะสมอยู่จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดและสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง (Hosoda et al., 2018; Finocchiaro et al., 2010) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีความสัมพันธ์ โดยมีค่า r เท่ากับ 0.988, $p < 0.05$ และ r เท่ากับ 0.774, $p < 0.01$ ตามลำดับ (Hosoda et al., 2018)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ และแดง พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานิน พบทั้งในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและแดง แต่จะพบปริมาณสูงกว่าในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ โดยเฉพาะพันธุ์เหนียวดำ นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ปริมาณโปรแอนโทไซยานิน พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีปริมาณโปรแอนโทไซยานินสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าค่าเฉลี่ยของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (Vichit and Saewan, 2015)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรแอนโทไซยานิน ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในรำข้าวที่มีสีม่วง และแดง พบว่า รำข้าวสีม่วงมีปริมาณสารต่าง ๆ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ารำข้าวแดง นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสารต่าง ๆ ร่วมกัน พบว่า มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 (Chen et al., 2016)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรแอนโทไซยานิน ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว น้ำตาล แดง และดำ พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีปริมาณโปรแอนโทไซยานินสูงที่สุด

รองลงมา คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ และพบเพียงเล็กน้อยในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล และขาว เช่นเดียวกับปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำเล็กน้อย และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณสารต่าง ๆ ร่วมกัน พบว่า สารเหล่านี้มีความสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 (Min et al., 2012)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าว

พันธุ์ข้าวที่ดี คือ พันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูง ไม่ไวต่อช่วงแสง ทนต่อโรคและแมลง มีคุณภาพการหุงต้มที่ดี และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง วิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ในปัจจุบันทำได้หลายวิธี (ประพาส, 2562; วรวิทย์, 2563) ได้แก่

1. การนำพันธุ์เข้ามาและการรวบรวมเชื้อพันธุ์ (introduction and germplasm collection) คือ การนำพันธุ์ข้าวจากแหล่งที่มีความแตกต่างกันเข้ามาปลูกทดสอบ เพื่อศึกษาลักษณะต่าง ๆ ถ้าพันธุ์ข้าวที่นำมาปลูกมีบางลักษณะที่ไม่เป็นที่ต้องการ อาจนำพันธุ์เหล่านี้มาใช้ในการผสมพันธุ์ เพื่อเอาเฉพาะลักษณะที่ดี ดังนั้น พันธุ์ข้าวที่มาจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งภายใน และภายนอกประเทศ อาจใช้เป็นพันธุ์ดีสำหรับปลูกหรือใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการผสมพันธุ์ได้ เนื่องจากบางลักษณะอาจไม่มีในพันธุ์ข้าวที่มีอยู่ในท้องถิ่น

2. การคัดพันธุ์ (selection) คือ การปรับปรุงคุณภาพของพันธุ์ที่มีให้ดีขึ้นอาจทำได้ 2 วิธี คือ การคัดเลือกพันธุ์รวม (mass selection) นำเมล็ดพันธุ์ของแต่ละพันธุ์มาปลูก เพื่อคัดเลือกต้นข้าวส่วนใหญ่ที่มีลักษณะดีและเหมือนกันไว้ แล้วทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดจากต้นเหล่านี้รวมกันและทดสอบหาพันธุ์ที่ดีที่สุด และการคัดเลือกพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) นำพันธุ์ข้าวที่ต้องการคัดพันธุ์บริสุทธิ์มาปลูก เพื่อคัดเลือกกลุ่มของต้นลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองในต้นเดียวกันและมีลักษณะเหมือนต้นเดิม การคัดเลือกแบบนี้จึงเป็นการคัดเลือกหาต้นที่มีลักษณะดี แต่ละต้นที่คัดเลือกเก็บเกี่ยวเมล็ดแยกกันเพื่อเอาไปปลูกทดสอบเป็นสายพันธุ์ต่าง ๆ และสายพันธุ์ที่ดีที่สุดเท่านั้นจะได้รับการคัดเลือกเป็นข้าวสายพันธุ์ใหม่

3. การผสมพันธุ์ (breeding selection) คือ การนำพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะดีอย่างใดอย่างหนึ่งของแต่ละพันธุ์มาผสมกัน เพื่อจะได้รวมเอาลักษณะดีต่าง ๆ ไว้ในต้นหรือพันธุ์เดียวกัน ซึ่งจะได้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง คุณภาพเมล็ดได้มาตรฐานและต้านทานโรค ข้าวเป็นพืชผสมตัวเอง และเมื่อผสมกันแล้ว ต้นลูกในชั่วที่ 2 จะมีการกระจายตัวมาก และการกระจายตัวนี้ จะลดน้อยลงเรื่อย ๆ จนถึงชั่วที่ 5 หรือชั่วที่ 6

4. การกลายพันธุ์ (mutation) คือ การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยใช้สารเคมีหรือกัมมันตภาพรังสี เนื่องจากสารเคมีบางจำพวก เช่น เอทิลีนไอมีน (ethylene imine; EI) และเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate; EMS) และกัมมันตภาพรังสี เช่น เอกซเรย์ (X-rays) แกมมาเรย์ (gamma-rays) สามารถทำให้ส่วนประกอบของโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมจนมีผลให้ต้นพืชนั้นมีพันธุกรรมผิดไปจึงแสดงออกเป็นลักษณะใหม่ที่ไม่เคยมีในพันธุ์นั้นมาก่อน เพื่อเปิดโอกาสให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชได้คัดเลือกเอาลักษณะใหม่ที่ดีไว้ ลักษณะใหม่ที่ได้นี้อาจไม่เคยมีมาก่อน ผลจากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศไทยได้มีข้าวพันธุ์ดีหลายพันธุ์ขยายออกให้ชาวนาปลูกในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามพันธุ์เหล่านี้จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงในอนาคต เพราะโรคและแมลงศัตรูข้าวชนิดใหม่ ๆ จะมีเกิดขึ้นซึ่งพันธุ์เหล่านี้อาจไม่ต้านทานในเวลานั้น จึงจำเป็นต้องหาพันธุ์ใหม่มาทดแทน

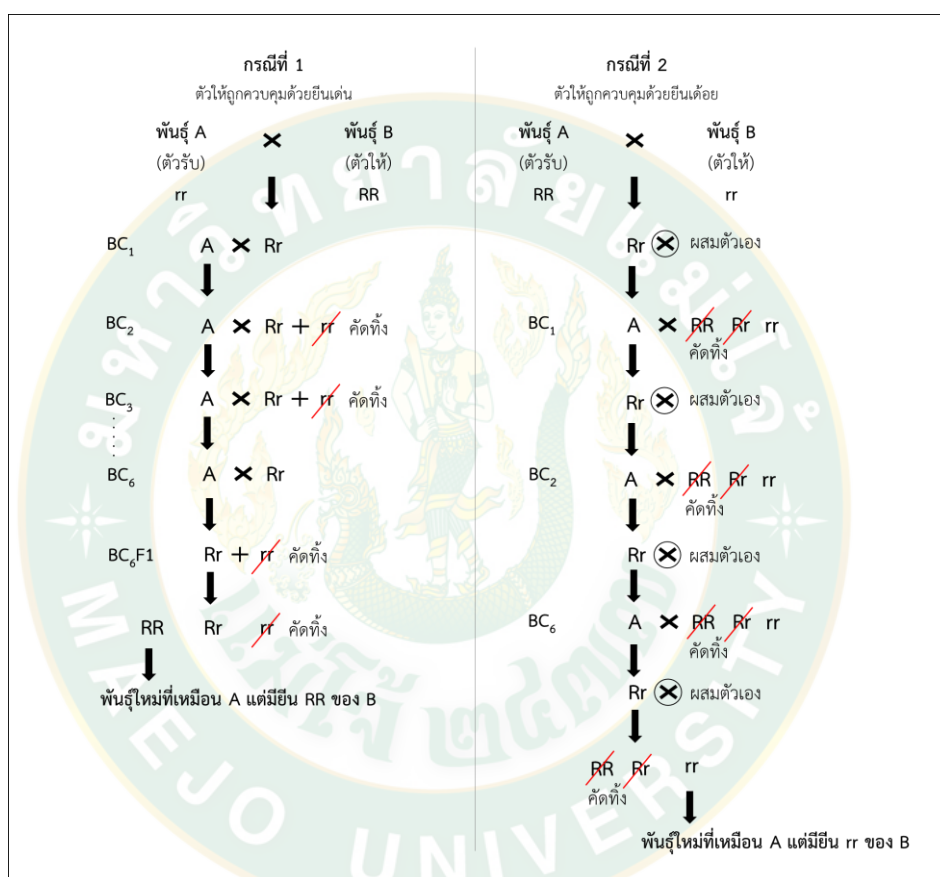
การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีผสมกลับ

การผสมกลับหรือการผสมย้อน (backcrossing) เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวอีกวิธีหนึ่งที่มีการถ่ายทอดลักษณะดีจากพันธุ์หนึ่งไปยังอีกพันธุ์หนึ่งอย่างได้ผล นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในกรณีที่ต้องการการถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนน้อยคู่ การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมกลับนั้นมักใช้ในกรณีที่มีพันธุ์ดีอยู่แล้ว แต่พันธุ์ที่มีอยู่ยังขาดลักษณะใดลักษณะหนึ่ง ซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ ตัวรับ (recurrent parent) เป็นพ่อหรือแม่พันธุ์ที่จะนำเอาลูกมาผสมเพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีเกือบทั้งหมดไว้ จะต้องเป็นพันธุ์ที่สามารถปรับตัวได้ดีในท้องถิ่นที่ปลูกและให้ผลผลิตสูง ตัวให้ (donor parent) เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการ ที่ไม่มีในตัวรับ และต้องการที่จะถ่ายทอดลักษณะนี้ไปไว้ในตัวรับ

วิธีการผสมกลับจะได้ผลดีก็ต่อเมื่อมีตัวรับที่ดี ลักษณะที่ถ่ายทอดจากตัวให้มีความคงที่ หลังจากการผสมกลับไปหลายครั้ง วิธีการผสมกลับ แบ่งออกเป็น 2 กรณี (ภาพที่ 5) คือ

กรณีที่ 1 ลักษณะที่ต้องการจะถ่ายทอดเป็นลักษณะเด่น (dominant) กรณีนี้จะสามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการได้ เนื่องจากลักษณะเด่นจะปรากฏออกมาให้เห็น เมื่อนำลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ผสมกลับไปหาตัวรับ จะได้เมล็ดลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1) นำเมล็ด BC_1 ไปปลูกคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีลักษณะตามต้องการ นำ BC_1 ผสมกลับไปหาตัวรับ จะได้เมล็ดลูกผสมกลับชั่วที่ 2 (BC_2) และคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีลักษณะตามต้องการ นำ BC_2 ผสมกลับไปยังตัวรับ จะได้เมล็ดลูกผสมกลับชั่วที่ 3 (BC_3) ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อย ๆ จนได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 5 (BC_5) จากนั้นทำการผสมตัวเอง (selfing) นำเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองไปปลูกทดสอบลักษณะดังกล่าว ทำการคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีลักษณะตามต้องการไว้ จะได้พันธุ์ข้าวที่มีลักษณะทั่วไปเหมือนพันธุ์แม่หรือตัวรับ และมีลักษณะตามต้องการของพันธุ์พ่อหรือพันธุ์ให้รวมอยู่ด้วย

กรณีที่ 2 ลักษณะที่ต้องการถ่ายทอดเป็นลักษณะด้อย (recessive) กรณีนี้จำเป็นต้องทำการผสมตัวเองก่อนการผสมกลับทุกครั้ง เนื่องด้วยลักษณะด้อยจะไม่แสดงออกมาในการผสมระหว่างพันธุ์รับและพันธุ์ให้ ซึ่งการผสมกลับจะกระทำไปจนถึง BC_5 เช่นเดียวกันกับลักษณะเด่น และจากนั้นก็ทำการผสมตัวเองให้กับต้น BC_5 เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มีลักษณะตามต้องการ (บุญหงษ์, 2557; สุทัศน์, 2553)



ภาพที่ 5 แผนผังแสดงการผสมกลับทั้ง 2 กรณี กรณีที่ 1 คือ ตัวให้ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น และกรณีที่ 2 คือ ตัวให้ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย

ที่มา: ดัดแปลงจาก สุทัศน์ (2553)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ

การศึกษาข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 และ 2 โดยทำการผสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง (ดำ) กับขาว จากการผสมของกลุ่มผสมระหว่างพันธุ์รับ Kewha (*PbPp*) ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำกับพันธุ์ให้ Kumgangbyeon (*pbPp*) ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว พบว่า ลูกผสมชั่วที่ 1 มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำเหมือนกับพันธุ์รับ และเมื่อทำการทดสอบไคสแควร์ลูกผสมชั่วที่ 2 พบว่า อัตราส่วนสีเยื่อหุ้มเมล็ด ดำ: ขาว เท่ากับ 3: 1 โดยกลุ่มผสมนี้พบลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดของลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 2 แบบ เท่านั้น คือ สีดำเหมือนพันธุ์รับและสีขาวเหมือนพันธุ์ให้ ส่วนกลุ่มผสมระหว่างพันธุ์รับ Heugnambyeon (*PbPp*) ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำกับพันธุ์ให้ Hwayongbyeon (*pbpp*) ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว พบว่า ลูกผสมชั่วที่ 1 มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล ไม่ดำเหมือนกับพันธุ์รับ และเมื่อทำการทดสอบไคสแควร์ลูกผสมชั่วที่ 2 พบว่า สีเยื่อหุ้มเมล็ดมีการกระจายตัวในอัตราส่วน ดำ: น้ำตาล: ขาว เท่ากับ 9: 3: 4 (Rahman et al., 2013; Rahman et al., 2016)

การศึกษาลูกผสมชั่วที่ 1, 2 และ 3 โดยทำการผสมข้าวระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำกับขาว จำนวน 3 กลุ่ม พบว่า ลักษณะสีดำบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด มีการกระจายตัวในชั่วที่ 2 จากการทดสอบไคสแควร์ในชั่วที่ 2 พบว่า มีอัตราส่วนการกระจายตัวของสีบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด คือ สีดำ: น้ำตาลเข้ม: แดง และขาว เท่ากับ 9 *Pb-Pp*: 3 *Pb-Pppp*: 3 *Pb-pppp*: 1 *pbpbpppp* (digenic) ($p>0.05$) ในทุกกลุ่มผสม แต่ในชั่วที่ 3 พบว่ามีอัตราส่วนการกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดต่างกัน โดยพบจำนวน 2 กลุ่มผสม ที่มีอัตราส่วนการกระจายตัวของสีบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด เท่ากับ 3: 1 (monogenic) ($p>0.05$) และอีก 1 กลุ่มผสม อัตราส่วนการกระจายตัวของสีบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด เท่ากับ 9: 3: 3: 1 (digenic) ($p>0.05$) (Basunanda and Murti, 2019)

การศึกษาลูกผสมชั่วที่ 1 และ 2 โดยทำการผสมข้าวระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำกับขาว และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงกับขาว พบว่า ลูกผสมชั่วที่ 1 ของกลุ่มผสม (ดำ กับ ขาว) มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำไม่เต็มเมล็ด แต่พบว่าลูกผสมชั่วที่ 1 ของกลุ่มผสมข้าวแดง มีเยื่อหุ้มเมล็ดเหมือนกับพันธุ์รับ และพบว่าลูกผสมชั่วที่ 2 ของกลุ่มผสม (แดง กับ ขาว) จำแนกสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ 2 แบบ คือ เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและขาว ในอัตราส่วน 3: 1 ส่วนลูกผสมชั่วที่ 2 ของกลุ่มผสม (ดำ กับ ขาว) จำแนกสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ 3 แบบ คือ สีน้ำตาลเข้มถึงดำ (fully anthocyanin) น้ำตาล (partially anthocyanin) และขาว ในอัตราส่วนใกล้เคียง 3: 1 สรุปว่า ลักษณะการเกิดสีดำจากแอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดของลูกผสมเป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (incomplete dominance) ส่วนลักษณะการเกิดสีแดงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดของลูกผสมเป็นแบบข่มสมบูรณ์ (full dominance) (Rysbekova et al., 2017)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอ ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต อาจมีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส หรือในออร์แกเนลล์ และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ซึ่งความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ (สุริพร, 2546) ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็นประเภทหลัก ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยใช้หลักการเข้าคู่ของลำดับเบส ดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทนี้ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) (Kochert, 1994; McCouch and Tanksley, 1991; Tanksley et al., 1989)

2. PCR-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยใช้หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ในการจำลองดีเอ็นเอ หรือเทคนิคพียูอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) เครื่องหมายประเภทนี้เป็นที่นิยมใช้ในงานด้านปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟพีดี (RAPD marker) (Williams et al., 1990) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) (Vos et al., 1995) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หรือ เอสเอสอาร์ (SSR marker) (Brown et al., 1996; Powell et al., 1996) เป็นต้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR (simple sequence repeat) หรือเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) หรือ short tandem repeat (STR) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง ของบริเวณลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยเบส 1-6 เบส พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ศึกษา พบกระจายอยู่ทั่วจีโนม ส่วนใหญ่อยู่บริเวณที่ไม่ใช่ยีนหรือส่วนนอกรหัสของยีน (non-coding region) โดยลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลท์ มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงชุดเดียวในจีโนม (unique sequence) นำมาออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพียูอาร์ การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงมีโอกาสดูขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จึงพบโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน

(codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต (homozygote) และเฮเทอโรไซโกต (heterozygote) ได้ (สุรินทร์, 2552; สุริพร, 2546)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามที่ต้องการ เน้นการคัดเลือกที่ยีนหรือจีโนไทป์ ทำให้คัดเลือกได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพ โดยไม่จำเป็นต้องรอทดสอบหรือคัดเลือกจากฟีโนไทป์ เหมือนกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม ทำให้ย่นระยะเวลาได้มาก ในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนหรือจำเพาะกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญ ซึ่งจะช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกพืชจากจีโนไทป์ ที่ไม่มีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง และสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต (วรารณ, 2561)

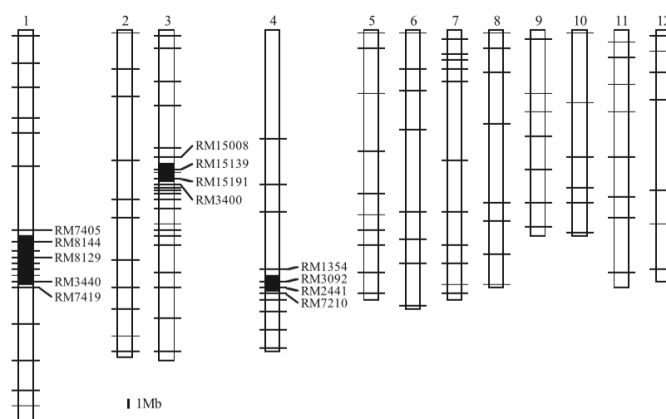
การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน รวมถึงโปรแอนโทไซยานินในข้าว พบว่า มีเครื่องหมายหลายชนิดที่จำเพาะหรือยึดติดกับยีนสำคัญและสามารถใช้คัดเลือกข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดแตกต่างกันได้ ดังจะกล่าวต่อไปนี้

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ที่จำเพาะกับยีน *OsB1* ที่พัฒนามาจากการเพิ่มของลำดับเบส GT (2-bp addition) บริเวณเอกซอนที่ 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดงมีการแทรกของลำดับเบส GT บริเวณเอกซอน 7 ทำให้พบแถบดีเอ็นเอขนาด 349 คู่เบส ในขณะที่ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพบแถบดีเอ็นเอขนาด 351 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 127 และ 222 คู่เบส ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำได้ (Lim and Ha, 2013) สอดคล้องกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ที่จำเพาะกับยีน *Pb* หรือ *OsB1* ในการแยกความแตกต่างของข้าวพันธุ์ *llpoombyeo* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว มีจีโนไทป์ คือ *pbpb* ออกจากข้าวพันธุ์ *Hugnumbyeo* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ มีจีโนไทป์ คือ *PbPb* (Rahman et al., 2013) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lee et al. (2018) พบว่า การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ที่จำเพาะกับยีน *Pb* สามารถแยกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ที่ขนาดแถบดีเอ็นเอ 1.2 กิโลเบส ออกจากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่ขนาดแถบดีเอ็นเอ 0.5 และ 0.7 กิโลเบส เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI นอกจากนี้การศึกษาของ Shao et al. (2011) พบว่า การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ที่จำเพาะกับยีน *Ra* หรือ *OsB1* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI สามารถแยกความแตกต่างของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดงได้ โดยข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและขาว จะพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 853 คู่เบส และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจะพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 533 และ 318 คู่เบส

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ที่จำเพาะกับยีน *OsC1* ที่พัฒนามาจากการขาดหายไปของดีเอ็นเอจำนวน 10 คู่เบส บริเวณเอกซอน 3 พบว่า สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (กาบใบม่วง) ออกจากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและขาว (กาบใบเขียว) ได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดต่างกัน คือ 257 คู่เบส ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ และ 247 คู่เบส ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและขาว ตามลำดับ (Rachasima et al., 2019; Saitoh et al., 2004)

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsB2 (kala4)*, *OsMYB3 (kala3)* และ *OsDFR (kala1)* คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM2441, RM15191 และ RM8129 ตามลำดับ จากการตรวจสอบสีเยื่อหุ้มเมล็ดโดยใช้เครื่องหมายเหล่านี้ พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดสีดำต้องมีการทำงานของยีนทั้ง 3 ตำแหน่งที่กล่าวไปแล้วข้างต้น นอกจากนี้พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM2441 เป็นเครื่องหมายสำคัญสามารถใช้ตรวจสอบข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลและดำได้ นอกจากนี้พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ดังกล่าวที่ยัดติดกับตำแหน่งยีน *Kala4*, *Kala3* และ *Kala1* มีความสัมพันธ์กับเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ สามารถใช้ตรวจสอบข้าวญี่ปุ่นชั่วรุ่น BC₄F₄ (ข้าวพันธุ์รับ Koshihikari ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ผสมกับ ข้าวพันธุ์ให้ Hong Xie Nuo ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ) ได้ (Maeda et al., 2014) (ภาพที่ 6)

การศึกษาของ Kumar et al. (2020) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsB2 (kala4)*, *OsMYB3 (kala3)* และ *OsDFR (kala1)* คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17305, RM15139 และ RM11541 ตามลำดับ ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และข้าวพื้นเมืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำของประเทศอินเดียได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในการตรวจสอบประชากรลูกผสมในชั่วที่ 2 และ 3 จากการผสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM252 บนโครโมโซมที่ 4 สามารถใช้ตรวจสอบข้าวลูกผสมที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลและดำได้ (Basunanda and Murti, 2019; Kristamtini et al., 2018) การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในการตรวจสอบข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดต่างกัน พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM251 บนโครโมโซม 3 สามารถแยกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดงได้ (Sari et al., 2021)



ภาพที่ 6 ตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีนสำคัญ 3 ยีน คือ ยีน *Kala1*, *Kala3* และ *Kala4* ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1, 3 และ 4 ตามลำดับ

ที่มา: Maeda et al. (2014)

การศึกษาของ Bounphanousay et al. (2008) ในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ จำแนกข้าวเหนียวดำออกจากข้าวขาว และยังสามารถจำแนกข้าวดำของประเทศลาวออกเป็น 4 กลุ่มได้ นอกจากนี้การศึกษาของ Vilayheuang et al. (2016) ในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำแนกพันธุ์ข้าวของประเทศลาวกับพันธุ์ข้าวประเทศเวียดนามได้ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Pusadee et al. (2019) พบว่าการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวดำของไทยออกจากกันได้ และในข้าวดำพื้นเมืองทุกพันธุ์ พบว่ามีระดับของความเป็นพันธุ์แท้ภายในพันธุ์สูง และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ที่ชัดเจน ดังนั้น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในการจำแนกพันธุ์ข้าวจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. กรรไกร (scissors)
2. กรรไกรตัดแต่งช่อดอกข้าว (inflorescence scissors)
3. กรงดักหนู (mousetrap)
4. กระดาษ A4 (A4 sheet)
5. กระดาษทิชชู (tissue paper)
6. กระติกน้ำแข็ง
7. กระติกน้ำร้อน
8. กระถางไม่มีรูขนาด 12 นิ้ว (plant potted plastic)
9. กระบอกตวง (measuring cylinder)
10. กล่องปิเปตทิป (pipette tips box)
11. กล่องพลาสติก (plastic box)
12. โกร่งบดสาร (mortar and Pestle)
13. ขวดเก็บสารเคมี (Duran)
14. ขวดแก้วเพาะเมล็ด
15. ขวดปริมาตร (volumetric flask)
16. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
17. คลิปหนีบกระดาษ
18. จอบ
19. ซ้อนตักสาร
20. ดิน
21. ดินสอ
22. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test tube Rack stainless)
23. ตาชั่งตักถ่าน
24. ถาดเก็บสาร (Reagent Reservoir)
25. ถุงกระดาษสำหรับเก็บเมล็ด

26. ถังกระดาษไซโครบดก
27. ถังพลาสติกทนร้อนและทนเย็น
28. ถังมือยาง
29. ถังตม้น้ำไฟฟ้า
30. ถังพ่นยาพลาสติก
31. พรอทวัดอุณหภูมิแบบแท่งแก้ว (Thermometer)
32. ที่วางไมโครปิเปต (Pipette Stands)
33. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic Stirring Bar)
34. แท่นวางหลอดทดลอง 4 ด้าน (4-Way Microtube Racks)
35. แท่นวางหลอด 1.5 ไมโครลิตร (80 Well Microtube Rack)
36. แท่นวางหลอดพีซีอาร์พร้อมฝาปิด (96 well PCR Tube Rack)
37. แท่นวางหลอดพีซีอาร์แบบเย็น (PCR Cooler Tube Rack)
38. นาฬิกาจับเวลา (stopwatch)
39. ปีกเกอร์ (Beaker)
40. บัวรดน้ำพลาสติก (plastic can watering)
41. ปากกา label
42. ปากคีบปลายแหลม (forceps)
43. ปากคีบ (forceps)
44. ป้าย (Tag)
45. ปิเปตแก้ว (Glass Measuring pipette)
46. ปิเปตทิปขนาด 10 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Pipette Tips)
47. ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 และ 12-24-12 (fertilizer)
48. ผลิตภัณฑ์กำจัดหนู (Ratsbane)
49. ผ้าโซล่อนสีดำ
50. แผ่นซีลปิดเพลท (PCR Plate Seal)
51. เพลทตกตะกอนดีเอ็นเอ (96-well PCR Plate)
52. เพลทพีซีอาร์ (96-well PCR Plate 0.2 ml)
53. เพลทวัดแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (96-well Microplate)
54. เพลทสกัดดีเอ็นเอ (96-Well DNA LoBind Deep Well Plates)
55. แผ่นฟรอยด์ (Aluminum Foil)
56. มีด (Knife)

57. เม็ดบีด (Glass beads)
58. เม็ดลูกปืน (stainless steel ball)
59. ไมโครปิเปต (Micropipette)
60. ไมโครปิเปตแบบหลายตำแหน่ง (Multichannel Micropipette)
61. ไม้ปักป้าย
62. ลูกยางปิเปต
63. สายยางรดน้ำต้นไม้
64. สารเคมีฆ่าแมลง
65. สติกเกอร์ใส (sticker)
66. สมุนไพรไล่หนู (ratsbane)
67. สำลี (cotton ball)
68. หนังยางรัดของ (plastic band)
69. หลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร
70. หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร
71. หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
72. หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
73. หลอดหยดพลาสติก (Dropper)
74. ไหมพรม
75. แอลกอฮอล์ (alcohol)

เครื่องมือ

1. กล้องสแตริโอ SD 3045 (Olympus, Japan)
2. เครื่องกวนสารและให้ความร้อน (Hotplate stirrer) (Jenway 1000, UK)
3. เครื่องเขย่าสารละลาย Vortex GENIE-2 (Scientific industry, USA)
4. เครื่องเขย่าสารละลายแบบวงกลม Innova 2100 (New Brunswick Scientific, USA)
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG802-s และ 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 (Mettler Toledo, Switzerland)
6. เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ (S1 Pipet Filler)
7. เครื่องบดละเอียดตัวอย่าง

8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Harrier 18/80 Refrigerated (Sanyo. UK)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge รุ่น Biofuge Pico (Sorvall, Germany)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพลท (Centrifuge 96 well Plate)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงเพลท (Centrifuge 96 well Plate)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น 100™ thermal cycler (Bio-Rad, USA)
14. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า หรือเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Spectrophotometer-plate reader รุ่น SPECTRO star Nano (BMG LabTech, Germany)
16. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง STARTER 3100 PH BENCH (OHAUS, China)
17. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
18. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
19. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
20. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
21. ตู้ดูดควัน (Fume Hood)
22. ตู้อบแห้ง ED115 (E2) (BINDER, Norway)
23. ไมโครเวฟ (microwave)
24. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
25. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

สารเคมี

1. 2-mercaptoethanol (BIO BASIC INC, Thailand)
2. 2, 2-Diphenyl-1-picryldrazyl (DPPH) (Sigma, USA)
3. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma, USA)
4. Absolute ethanol (Merck, Germany)
5. Acetic acid (Merck, Germany)
6. Agarose (Invitrogen, USA)
7. Boric acid (Fisher scientific, UK)

8. Chloroform (LAB-SCAN, Thailand)
9. Deionized Water (RCI LABSCAN, Thailand)
10. Diaminoethanetertra-acid disodium salt (EDTA) (Fisher scientific, UK)
11. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
12. Methanol for analysis EMSURE® (Merck, Germany)
13. Mineral oil (Himedia, China)
14. My Taq HS Red Mix, PCR Master Mix (BIOLINE, USA)
15. Potassium chloride (Merck, Germany)
16. Sodium acetate (Merck, Germany)
17. Tris base (Himedia, China)
18. สีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, USA)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1. GeneRuler 100 bp Ladder Plus (Thermo fisher, USA)
2. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo fisher, USA)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ใช้ในงานวิจัย สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์จากบริษัท Integrated DNA Technologies (IDT®), ประเทศสิงคโปร์ (Singapore)

1. SSR markers ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*
2. SSR markers ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR*
3. SSR markers ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3*

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา

1. ประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับ พันธุ์ให้ก้าน้อย จำนวน 300 ต้น
2. ประชากร BC_1F_1 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับ พันธุ์ให้ F_1 จำนวน 318 ต้น

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 9 ขั้นตอน ดังนี้

1. การศึกษาพันธุ์ข้าว และสร้างประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ช่วงที่ 1 (BC_1F_1)
 - 1.1 การศึกษาพันธุ์ข้าวและสร้างประชากร
 - 1.2 การผสมข้าวโดยวิธีการใช้น้ำร้อน
2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนข้าวด้วยวิธี mCTAB
 - 2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เพลท 96 ช่อง
 - 2.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
 - 2.3 การเจือจางดีเอ็นเอโดยใช้เพลท 96 ช่อง
3. การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* และ *OsMYB3*
 - 3.1 การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*
 - 3.2 การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน *OsDFR*
 - 3.3 การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3*
4. การทดสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ พันธุ์รับ พันธุ์ให้ และลูกผสม F_1
 - 4.1 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ
 - 4.2 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ
 - 4.3 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอกับประชากร F_2 บางส่วน
5. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร F_2
 - 5.1 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR
 - 5.2 การทดสอบโคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR
 - 5.3 การวิเคราะห์ถ้อยทัศน์ด้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH
6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับถ้อยทัศน์ด้านอนุมูลอิสระ ในประชากร F_2
7. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร BC_1F_1
 - 7.1 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR
 - 7.2 การทดสอบโคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR
 - 7.3 การวิเคราะห์ถ้อยทัศน์ด้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH
 - 7.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH Differential
 - 7.5 การวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด

8. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับพีนไทป์ ในประชากร BC_1F_1

9. การคัดเลือกต้น BC_1F_1 และผลิตเมล็ด BC_2F_1

9.1. การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ของทุกเครื่องหมาย และตรวจสอบด้วยเครื่องหมายที่خابอีกข้างหนึ่งของยีน

9.2. การผลิตเมล็ดข้าวผสมกลับครั้งที่ 2 ช่วงที่ 1 (BC_2F_1)

9.3. การวิเคราะห์พีนไทป์ของต้นคัดเลือก BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้

1. การศึกษาพันธุ์ข้าว และสร้างประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ช่วงที่ 1 (BC_1F_1)

1.1 การศึกษาพันธุ์ข้าวและสร้างประชากร

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาแบ่งออกเป็น ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ พันธุ์ Nipponbare (Nip), กข-แม่โจ้ 2 (RD-MAEJO 2), ปทุมธานี 1 (PTT1) ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ก้าน้อย (KNO), ก่ำใหญ่ (KY) และ มะลิดำ (MLDUM) ได้รับความอนุเคราะห์จากข้าวพื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดิน สำนักงานปฏิรูปที่ดิน อำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร

ศึกษาข้าวลูกผสมช่วงที่ 1 (F_1) และประชากรช่วงที่ 2 (F_2) ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ คือ ปทุมธานี 1 กับ พันธุ์ให้ก้าน้อย จากงานวิจัยของ อนงค์นาฏ (2564) โดยนำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR และนำเมล็ดมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2

สร้างประชากรข้าวผสมกลับครั้งที่ 1 ช่วงที่ 1 (BC_1F_1) โดยทำการผลิตเมล็ด BC_1F_1 โดยใช้ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นพันธุ์รับและข้าวลูกผสม F_1 เป็นพันธุ์ให้ ในฤดูนาปี พ.ศ. 2562 (กรกฎาคม-ธันวาคม) จากนั้นนำเมล็ด BC_1F_1 มาปลูกในโรงเรือนที่สภาพแวดล้อมเดียวกัน จำนวน 321 ต้น ในฤดูนาปี พ.ศ. 2563 (กรกฎาคม-ธันวาคม) นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR เก็บเมล็ด BC_1F_2 ที่อยู่บนต้น BC_1F_1 และนำเมล็ดมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด จากนั้นหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะดังกล่าวในประชากร BC_1F_1

การคัดเลือกต้น BC_1F_1 โดยคัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* แบบ heterozygous ทุกเครื่องหมาย สำหรับใช้เป็นพันธุ์ให้ในการนำไปผสมกลับกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 ในฤดูนาปี พ.ศ. 2563 (กรกฎาคม-ธันวาคม) เพื่อผลิตเมล็ดข้าวผสมกลับครั้งที่ 2 ช่วงที่ 1 (BC_2F_1 seeds) สำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมกลับในรุ่นต่อไป และเก็บเมล็ด BC_1F_2 ที่อยู่บนต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จำนวน 15 ต้น นำเมล็ดมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด

1.2 การผสมข้าวโดยวิธีการใช้น้ำร้อน

เป็นเทคนิคการผสมพันธุ์ข้าวโดยอาศัยวิธีการกำจัดเกสรเพศผู้ของข้าวพันธุ์รับ (Emasculation) เมื่อข้าวที่ต้องการผสมออกดอกพร้อมกัน ด้วยวิธีการใช้น้ำร้อน (Hot Water Method) ดัดแปลงจาก วรวิทย์ (2563) มีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 เตรียมต้นข้าวพันธุ์รับโดยคัดเลือกต้นข้าวที่มีดอกข้าวบนช่อดอกหลายดอกที่จะบานภายในวันที่จะทำการผสม สังเกตได้จากอับละอองเรณูเพศผู้จะเลื่อนขึ้นมายู่สูงก่อนบริเวณปลายดอก

1.2.2 นำกระถางที่เลือกมาเอียงลงเพื่อโน้มช่อดอกข้าวให้แขวนในกระตักน้ำร้อน โดยอุณหภูมิน้ำร้อนที่ใช้ประมาณ 43 องศาเซลเซียส แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกสรเพศผู้เป็นหมันชั่วคราว เมื่อนำช่อดอกข้าวออกจากกระตักน้ำร้อนดอกข้าวที่อยู่ในระยะผสมพันธุ์กลีบดอกจะบานออกภายใน 1-5 นาที (ภาพที่ 7A-1B)

1.2.3 ตัดแต่งดอกข้าวโดยตัดดอกที่ยังไม่บานและดอกที่ยังอ่อนอยู่ทิ้ง จากนั้นใช้ปากคีบปลายแหลม (forceps) คีบอับละอองเกสรเพศผู้ของดอกที่บานออกให้หมด (พยายามอย่าให้ปลายปากคีบโดนเกสรเพศเมีย เนื่องจากจะซ้ำและอาจทำให้ผสมไม่ติด) นำถุงกระดาษไขคลุมช่อดอกที่ได้ตกแต่งไว้แล้ว เพื่อป้องกันเกสรเพศเมียแห้ง จากนั้นรอการผสมเกสรต่อไป (ภาพที่ 7C-D)

1.2.4 การผสมเกสร (fertilization) เลือกเก็บอับเรณูที่แก่จากดอกข้าวที่ใช้เป็นต้นพ่อหรือพันธุ์ให้ โดยดอกข้าวจะเริ่มบานตั้งแต่เวลา 08.00 น. และจะบานมากที่สุดเวลา 10.00 น. การตรวจดูเกสรที่พร้อมผสมทำได้โดยใช้ปากคีบ คีบอับเรณูแล้วกดลงกับเล็บ ถ้าเกสรเพศผู้เหมาะที่จะผสมพันธุ์อับละอองเรณูจะแตก

1.2.5 เมื่อถึงเวลาเหมาะสมที่ดอกข้าวบาน กลีบดอกและอับละอองเรณูจะเปิดออกพร้อมกัน ใช้ปากคีบปลายแหลม คีบอับละอองเรณูของพันธุ์ให้มาเคาะหรือแตะบริเวณยอดเกสรเพศเมียของพันธุ์รับที่ได้กำจัดเกสรเพศผู้ออกแล้วในขั้นตอนโดยทำอย่างเบามือ และต้องระวังอย่าให้ปลายปากคีบโดนเกสรเพศเมีย เนื่องจากดอกจะซ้ำและอาจทำให้ผสมไม่ติด (ภาพที่ 7E-F)

1.2.6 เมื่อผสมดอกข้าวที่ตัดแต่งไว้บนช่อดอกจนครบทุกดอก คลุมดอกข้าวด้วยถุงกระดาษไข พร้อมเขียนชื่อพันธุ์ข้าว พันธุ์รับ พันธุ์ให้ วันที่ผสม และผู้ผสม ผูกช่อดอกข้าวที่ผสมเสร็จแล้วกับหลักไม้เพื่อป้องกันไม่ให้ช่อดอกหัก หลังจากผสมแล้ว 4-5 วัน สามารถตรวจสอบผลการผสมข้าวได้ โดยดอกที่ผสมติดจะสังเกตเห็นว่ามีเมล็ดอ่อนเกิดขึ้น ส่วนดอกที่ผสมไม่ติดจะมีสีซีด หรือแห้งตายไป สามารถเก็บเมล็ดหลังการผสมเมื่อครบระยะเวลาประมาณ 25 ถึง 30 วัน (ภาพที่ 7G)



ภาพที่ 7 การผสมข้าวด้วยวิธีการใช้น้ำร้อน (A-B) กำจัดอับละอองเรณู (C-D) ตัดแต่งช่อดอกกำจัดเกสรเพศผู้ (E-F) ผสมข้าวพันธุ์รับกับพันธุ์ให้ (G) ครอบรวงข้าวด้วยถุงกระดาษไข

2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนข้าวด้วยวิธี mCTAB

นำใบอ่อนข้าวของพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ พันธุ์ Nipponbare กข-แม่โจ้ 2 และปทุมธานี 1 ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ พันธุ์พื้นเมือง ก่ำใหญ่ กำน้อย และมะลิดำ ลูกผสม F_1 ประชากร F_2 และประชากร BC_1F_1 มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี mCTAB (modified cetyltrimethylammonium bromide) ดัดแปลงจาก Hwang and Kim (2000) การสกัดดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การสกัดโดยใช้เพลท 96 ช่อง (96 deep well plate) และการสกัดโดยใช้หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เพลท 96 ช่อง

วิธีนี้ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของประชากร F_2 จำนวน 288 ต้น มีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 นำใบอ่อนข้าวมาเจาะด้วยเครื่องเจาะกระดาษให้เป็นชิ้นส่วนรูปร่างกลมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใส่ลงในเพลทขนาด 96 ช่อง จำนวน 6 ชิ้น ต่อ 1 ช่อง แล้วใส่เม็ดบีดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร จำนวน 3 เม็ด ต่อ 1 ช่อง โดยเรียงตัวอย่างตามแนวตั้งช่อง 1A-1H คือ ตัวอย่างที่ 1-8 แล้วเริ่มตัวอย่างที่ 9-16 ในช่อง 2A-2H ทำเช่นนี้ไปจนครบทั้งหมด 3 เพลท จะได้ตัวอย่างทั้งหมด 288 ต้น (ภาพที่ 8)

เพลท 96 ช่อง สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

ภาพที่ 8 การเรียงตัวอย่างของประชากร F_2 ในวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เพลท 96 ช่อง เพลทที่ 1

2.1.2 เติมสารละลาย mCTAB ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 2-mercaptoethanol (อัตราส่วน mCTAB 100 ไมโครลิตร เติม 2-mercaptoethanol 1 ไมโครลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปิดด้วยสติกเกอร์ใสให้แน่นจำนวน 2 ชั้น นำเข้าเครื่องตีตัวอย่าง 2 รอบ รอบละ 1 นาที กับอีก 30 วินาที

2.1.3 ปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพลท (centrifuge plate) ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติม mCTAB ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตหลายตำแหน่ง (multichannel micropipette) ปิดด้วยสติกเกอร์ใส บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.1.4 ปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพลท ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย้ายส่วนใสใส่เพลทใหม่ เติมเอนไซม์ RNase A (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิดด้วยสติกเกอร์ใส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

2.1.5 เติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย mCTAB ปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพลท ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ย้ายส่วนใสใส่เพลทเพื่อตกตะกอน (deep well plate V-bottom)

2.1.6 เติม absolute ethanol เย็น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หรือ ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย หากสารละลายไม่ขุ่น เติม 3M sodium acetate, pH 5.2 และ ปิดด้วยสติกเกอร์ใส แช่สารละลายในเพลท ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือแช่เย็น

2.1.7 ปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพลท ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพลท ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ

2.1.8 ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งประมาณ 15 นาที ละลายตะกอนด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

2.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

วิธีนี้ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ Nipponbare กข-แม่โจ้ 2 กำใหญ่ มะลิดำ พันธุ์รับพุ่มธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย ลูกผสม F₁ ประชากร F₂ ต้นที่ 289-300 และประชากร BC₁F₁ จำนวน 321 ต้น มีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 ตัดใบอ่อนข้าวใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่เม็ดยัดขนาด 3 มิลลิเมตร จำนวน 3 เม็ด เติมน้ำละลาย mCTAB ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องตีตัวอย่าง เป็นเวลา 1 นาที กับอีก 30 วินาที ทำซ้ำจำนวน 2 รอบ

2.2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (กลับหลอดเพื่อผสมเมื่อครบทุก 10 นาที) จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่

2.2.3 เติมน้ำ RNase A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต่อสารละลาย 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำคลอโรฟอร์มปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่

2.2.4 เติมน้ำ 3M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1 ต่อ 10 เท่าของสารละลาย จากนั้นเติม absolute ethanol เย็น ปริมาตร 2 เท่า ของสารละลายทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่นของดีเอ็นเอ แช่วสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หรือข้ามคืน

2.2.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้องทำซ้ำ 2 รอบ

2.2.6 ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ตะกอนจะเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีขาวใส ละลายตะกอนด้วย 10 mM Tris-HCL, pH 8.0 ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับปริมาณของ ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้)

2.3 การเจือจางดีเอ็นเอโดยใช้เพลท 96 ช่อง

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีที่สกัดโดยใช้เพลท และวิธีที่สกัดโดยใช้หลอด จากข้อ 2.1 และ 2.2 มาทำการเจือจางดีเอ็นเอโดยใช้เพลท 96 ช่อง ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอของพันธุ์รับ ปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย ประชากร F_2 และประชากร BC_1F_1 นำดีเอ็นเอมาเจือจางในเพลท 96 ช่อง ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณ 30-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยหนึ่งเพลทประกอบไปด้วย ช่อง 1A ถึง 12H แนวตั้งเป็นตัวอักษร A-H แนวนอนเป็นตัวเลข 1-12 ใน 1 เพลทจะสามารถเจือจางดีเอ็นเอได้จำนวน 88 ตัวอย่าง เนื่องจากช่องที่ 1A-1H จะใช้สำหรับเจือจางตัวอย่างของพันธุ์รับปทุมธานี 1 สลับกับพันธุ์ให้ก้าน้อย โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ 1 เริ่มตั้งแต่ช่อง 2A ตัวอย่างที่ 2 ช่อง 2B ตัวอย่างที่ 3 ช่อง 3A ตัวอย่างที่ 4 ช่อง 4B จะทำเช่นนี้ไปจนครบถึงตัวอย่าง ที่ 88 ช่องที่ 12H ทั้งนี้เพื่อให้สะดวกและทำให้ไม่เกิดการผิดพลาดต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในขั้นตอนต่อไป

เพลท 96 ช่องสำหรับเจือจางดีเอ็นเอ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
B	P2	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
C	P1	23	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43
D	P2	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44
E	P1	45	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65
F	P2	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66
G	P1	67	69	71	73	75	77	79	81	83	85	87
H	P2	68	70	72	74	76	78	80	82	84	86	88

 ประชากร F_2 หรือ BC_1F_1
 P1 พันธุ์รับปทุมธานี 1
 P2 พันธุ์ให้ก้าน้อย

ภาพที่ 9 การเจือจางดีเอ็นเอของประชากร F_2 และ BC_1F_1 ในเพลท 96 ช่อง

3. การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

การค้นหาตำแหน่งบนโครโมโซมข้าวของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีนควบคุมและยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด ซึ่งประกอบด้วย 4 ยีน ได้แก่ ยีนควบคุม 3 ยีน คือ *OsB1*, *OsB2* และ *OsMYB3* ยีนโครงสร้าง 1 ยีน คือ *OsDFR* สามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูลพันธุกรรมข้าว Gramene (<http://www.gramene.org/markers/microsat/>) ซึ่งได้รวบรวมเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนโครโมโซมของข้าวพันธุ์ Nipponbare ไว้ในตาราง Supplementary table 18 จากนั้นทำการดาวน์โหลดตาราง Supplementary table 18 เพื่อแทรกตำแหน่งของแต่ละยีน ที่สืบค้นได้บนฐานข้อมูล GenBank

ตารางที่ 1 ยีนควบคุมและยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด

ยีน	ชื่ออื่นของยีน	ตำแหน่งยีน (Locus ID)*	โครโมโซมที่
<i>OsB1</i> (Sakamoto et al., 2001)	<i>Pb</i> (Rahman et al., 2013) <i>Ra</i> (Hu et al., 1996)	Os04g0557800	4
<i>OsB2</i> (Sakamoto et al., 2001)	<i>kala4</i> (Maeda et al., 2014)	Os04g0557500	4
<i>OsDFR</i> (Nakai et al., 1998)	<i>Rd</i> (Furukawa et al., 2007) <i>Pp</i> (Rahman et al., 2013) <i>kala1</i> (Maeda et al., 2014)	Os01g0633500	1
<i>OsMYB3</i> (Maeda et al., 2014)	<i>kala3</i> (Maeda et al., 2014)	Os03g0410000	3

หมายเหตุ * คือ ข้อมูลตำแหน่งยีนมาจากฐานข้อมูล Rice Annotation Project (RAP)

3.1 การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*

จากการตรวจเอกสารพบว่า ยีน *OsB1/Pb/Ra* หรือ Os04g0557800 (Hu et al., 1996; Rahman et al., 2013; Sakamoto et al., 2001) และยีน *OsB2/kala4* หรือ Os04g0557500 ตั้งอยู่บนโครโมโซม 4 (Maeda et al., 2014; Sakamoto et al., 2001) ทำการหาดำแหน่งยีน *OsB1* และ *OsB2* จากฐานข้อมูล GenBank ของข้าวพันธุ์ Nipponbare พบว่า ยีน *OsB1* อยู่ตำแหน่งที่ 27,948,854 ถึง 27,956,890 คู่เบส และ ยีน *OsB2* อยู่ตำแหน่งที่ 27,916,190 ถึง 27,916,850 คู่เบส แสดงให้เห็นว่า ยีน *OsB1* อยู่ติดกับยีน *OsB2* (linked genes) จึงกำหนดการเขียนสัญลักษณ์ของทั้ง 2 ยีน คือ *OsB1&B2* หาเครื่องหมายที่ขนานข้างยีนทั้ง 2 โดยแทรกตำแหน่งยีน *OsB1&B2* ในตาราง Supplementary table 18 พบว่า ตำแหน่งยีนอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM17324 (ตำแหน่งที่ 27,839,532 ถึง 27,839,552 คู่เบส) และ RM17327 (ตำแหน่งที่ 27,988,340 ถึง 27,988,363 คู่เบส) คัดเลือกเครื่องหมายที่ให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 100 ถึง 300 คู่เบส ที่ขนานข้างยีนทั้งสองด้าน ด้านละ 10 เครื่องหมาย แล้วส่งสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายที่คัดเลือก

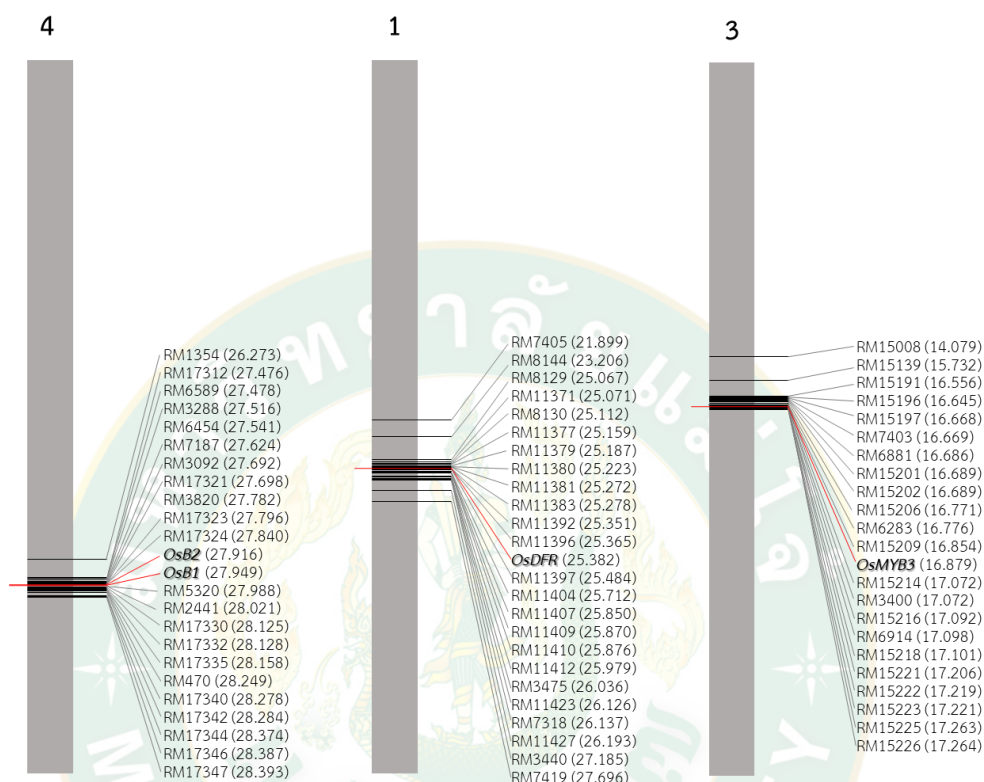
3.2 การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsDFR*

จากการตรวจเอกสารพบว่า ยีน *OsDFR/Rd/Pp/kala1* หรือ Os01g0633500 ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 (Furukawa et al., 2007; Maeda et al., 2014; Nakai et al., 1998; Rahman et al., 2013) ทำการหาดำแหน่งยีน *OsDFR* จากฐานข้อมูล GenBank ของข้าวพันธุ์ Nipponbare พบว่า ยีน *OsDFR* อยู่ตำแหน่งที่ 25,381,935 ถึง 25,385,548 คู่เบส หาเครื่องหมายที่ขนานข้างยีน โดยแทรกตำแหน่งยีน *OsDFR* ในตาราง Supplementary table 18 พบว่า ตำแหน่งยีนอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM11396 (ตำแหน่งที่ 25,364,673 ถึง 25,364,693 คู่เบส) และ RM11397 (ตำแหน่งที่ 25,484,268 ถึง 25,484,294 คู่เบส) คัดเลือกเครื่องหมายที่ให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 100 ถึง 300 คู่เบส ที่ขนานข้างยีนทั้งสองด้าน ด้านละ 10 เครื่องหมาย แล้วส่งสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายที่คัดเลือก

3.3 การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3*

จากการตรวจเอกสารพบว่า ยีน *OsMYB3/kala3* หรือ Os03g0410000 ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 3 (Maeda et al., 2014) ทำการหาดำแหน่งยีน *OsMYB3* จากฐานข้อมูล GenBank ของข้าวพันธุ์ Nipponbare พบว่า ยีน *OsMYB3* อยู่ตำแหน่งที่ 16,879,444 ถึง 16,880,495 คู่เบส หาเครื่องหมายที่ขนานข้างยีน โดยแทรกตำแหน่งยีน *OsMYB3* ในตาราง Supplementary table 18 พบว่า ตำแหน่งยีนอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM15209 (ตำแหน่งที่ 16,854,329 ถึง 16,854,349 คู่เบส) และ RM15214 (ตำแหน่งที่ 17,071,848 ถึง 17,071,867 คู่เบส) (ภาพที่ 10) คัดเลือก

เครื่องหมายที่ให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ ประมาณ 100 ถึง 300 คู่เบส ที่ขนาดข้างยีนทั้งสองด้าน ด้านละ 10 เครื่องหมาย แล้วส่งวิเคราะห์ไพโรเมอร์สำหรับเครื่องหมายที่คัดเลือก



ภาพที่ 10 แผนที่ตำแหน่งเครื่องหมาย RM และตำแหน่งยีน *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* บนโครโมโซมที่ 4, 1 และ 3 ตามลำดับ ที่ขนาดข้างยีนทั้งสองด้าน ด้านละ 10 เครื่องหมาย ตัวเลขในวงเล็บ คือ ตำแหน่งของเครื่องหมายที่อยู่บนโครโมโซมข้าว มีหน่วยเป็นกิโลเบส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ricebase (2564)

4. การทดสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ พันธุ์รับ พันธุ์ให้ และลูกผสม F_1

4.1 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ

นำจีโนมดีเอ็นเอของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ พันธุ์ Nipponbare ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) กข-แม่โจ้ 2 ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ พันธุ์กำแพงแสน กำน้อย (พันธุ์ให้) มะลิดำ ลูกผสม F_1 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมดีเอ็นเอประมาณ 30-50 นาโนกรัม ไพโรเมอร์ความเข้มข้น

0.5 ไมโครโมลาร์ 1x My Taq HS Red Mix (Bioline, USA) องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และสถานะในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ ดังนี้

องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x My Taq HS Red mix	10
10 μ M Primer _F	1
10 μ M Primer _R	1
gDNA (30-50 ng/ μ l)	1
dH ₂ O	7
รวม	20

สถานะในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	35
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1

วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้นเจลอะกาโรส 4 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, USA) เป็นส่วนประกอบ ใน 0.5X TBE buffer (Tris-borate-EDTA) เย็น ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 10 นาที ในที่มืด ถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวี ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ในแต่ละเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ

4.2 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ

จากขั้นตอนการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ทำการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ของแต่ละเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ 1 และข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อยได้ โดยเลือกเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอของพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ที่คมชัด และมีเพียง 1 แถบ (single band) ที่มีขนาดห่างกันพอสมควร และสามารถตรวจสอบข้าวลูกผสม F_1 ได้ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ Nipponbare (ชุดควบคุม) ต้องมีขนาดแถบดีเอ็นเอตรงตามที่รายงานไว้ในตาราง Supplementary table 18 จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 1 เครื่องหมาย ต่อ 1 ยีน ไปใช้ในการทดสอบกับประชากร F_2 บางส่วน โดยเลือกเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งยีนมากที่สุด โดยมีระยะห่างไม่ควรเกิน 5 cM (5,000 กิโลเบส) (Collard and Mackill, 2008)

4.3 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอกับประชากร F_2 บางส่วน

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้ จำนวน 1 เครื่องหมายต่อ 1 ยีน มาทดสอบกับประชากร F_2 บางส่วน คือ เครื่องหมาย RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ

5. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร F_2

5.1 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าว ได้แก่ พันธุ์รับพันธุ์ 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และประชากร F_2 ทั้งหมดจำนวน 300 ต้น มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในเพลท 96 ช่อง ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเพลท 1 ช่อง เท่ากับ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอประมาณ 30-50 นาโนกรัม ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ 1x My Taq HS Red Mix (Bioline, USA) องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และสภาวะในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ของยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* โดยในขั้นตอน Annealing สำหรับยีน *OsB1&B2* ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนยีน *OsDFR* และ *OsMYB3* ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ดังนี้

องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์

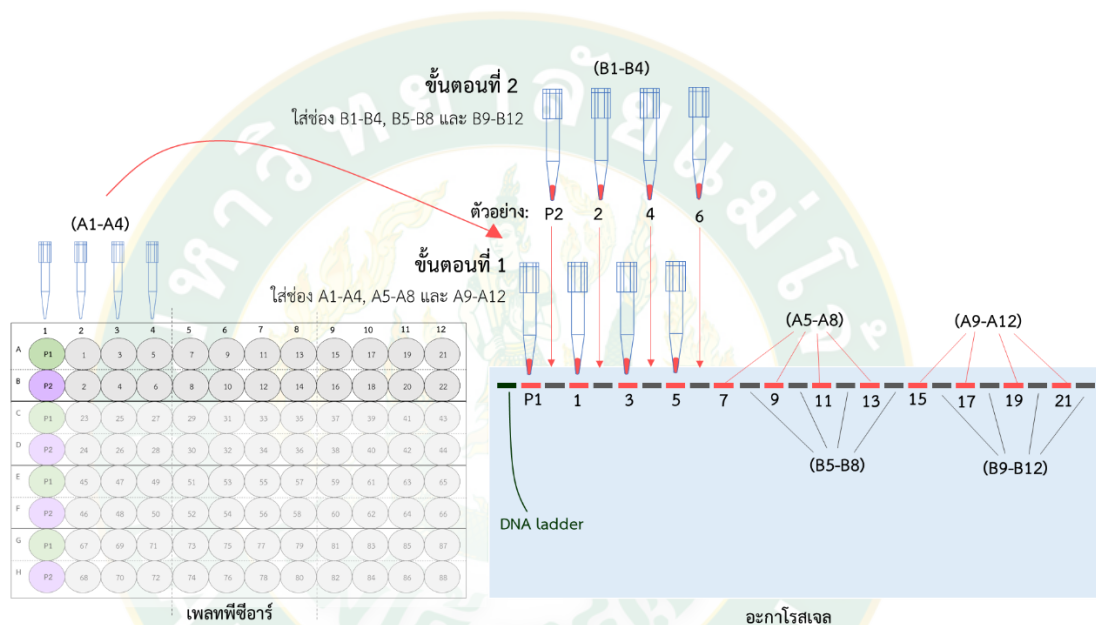
องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x My Taq HS Red mix	7.5
10 μ M Primer _F	0.75
10 μ M Primer _R	0.75
gDNA (30-50 ng/ μ l)	0.75
dH ₂ O	5.25
รวม	15

สถานะขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	35
Annealing	60 หรือ 58	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1

วิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีสีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, USA) เป็นส่วนประกอบ ความเข้มข้น เจลอะกาโรส 4 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer (Tris-borate-EDTA) เย็น ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 10 นาที ในที่มีด ถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวี ตรวจสอบความแตกต่าง ระหว่างแถบดีเอ็นเอในประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ สังเกตแถบ ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยจะพบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1. แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ พันธุ์รับพุ่มธานี 1 (PP) จำนวน 1 แถบ แบบที่ 2. แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับพันธุ์ให้ก้าน้อย (KK) จำนวน 1 แถบ และแบบที่ 3. แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับพันธุ์รับพุ่มธานี 1 (P) และพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) อย่างละ 1 แถบ (KP)

การทำเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะใช้ปิเปตแบบหลายช่อง ขั้นตอนในการคัดตัวอย่างทำได้โดย นำไมโครปิเปตแบบหลายช่องมาเสียบทึบจำนวน 4 ช่อง คัดตัวอย่างในเพลทฟิชีอาร์ 4 ช่อง โดยเริ่มจากแถว A ซึ่งแบ่งคัดแถวละ 3 ครั้ง คือ ช่อง A1-A4, A5-A8 และ A9-A12 ใส่ในหลุมเจล 25 ช่องที่เตรียมไว้ ตามลำดับ โดยความกว้างของทึบจะเท่ากับ 1 หลุม เว้น 1 หลุมในช่องเจล ทำการโหลดแถว A จนครบ (ขั้นตอนที่ 1) จากนั้นคัดตัวอย่างแถว B คือ B1-B4 ใส่ในหลุมเจลต่อจากช่อง A1 ตามด้วย B5-B8 และ B9-B12 (ขั้นตอนที่ 2) ดังภาพที่ 11 เมื่อโหลดตัวอย่างครบทั้งหมด 24 ช่อง แล้ว จำนวนตัวอย่างจะเท่ากับจำนวนหลุมเจล 1 เจลพอดี



ภาพที่ 11 การทำเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ปิเปตแบบหลายช่อง เพื่อวิเคราะห์ผลผลิตฟิชีอาร์จากเพลท 96 ช่อง

5.2 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

การทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR*, และ *OsMYB3* ในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น วิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอ (จีโนไทป์) กำหนดให้สัญลักษณ์

KK คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนของพันธุ์ให้กำเนิด

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนของพันธุ์รับปทุมธานี 1

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนของพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1

ทดสอบไคสแควร์ (Chi-square) โดยใช้โปรแกรม Minitab 18 เพื่อศึกษาการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน ว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่ ทำการวิเคราะห์การถ่ายทอด 1 เครื่องหมายต่อ 1 ยีน ของประชากร F_2 โดยมีสมมติฐานอัตราส่วนการกระจายตัวของเครื่องหมาย เท่ากับ 1KK: 2KP: 1PP

5.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

5.3.1 การเตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าว ตัดแปลงวิธีจาก Shao et al. (2014)

ทำการซังเมล็ดของต้นข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย ลูกผสม F_1 และประชากร F_2 จำนวน 300 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม (0.1 กรัม) ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่มีเม็ดลูกปัด (stainless steel ball) จำนวน 3 เม็ด นำเข้าเครื่องตีตัวอย่างจนเมล็ดข้าวละเอียดมีลักษณะคล้ายผงแป้ง เติมน้ำละลายเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าในที่มืดที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ แบ่งสารสกัดมาเจือจางด้วยเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น 4 เท่าของสารละลายตั้งต้น ปริมาตรสุดท้าย 400 ไมโครลิตร เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

5.3.2 การเตรียมสารอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH[•] (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

ซังสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] ปริมาณ 4 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องซัง 4 ตำแหน่ง ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

5.3.3 การเตรียมสารมาตรฐาน Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ตัดแปลงวิธีจาก Zhu et al. (2017)

เตรียมสาร Trolox ความเข้มข้นสาร 1,000 ppm (ไมโครกรัมต่อลิตร) ซังสารปริมาณ 100 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องซัง 4 ตำแหน่ง ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เจือจางสาร Trolox เป็น 8 ระดับ ด้วยสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 และ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นแต่ละระดับมีปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

5.3.4 การวัดค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เพลท 96 ช่อง

ปิเปตสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในเพลทวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่อง 12H วัดช่วงค่าการดูดกลืนแสง (wave range absorbance) ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุดของ DPPH[•] อยู่ในช่วง A₅₁₆ ถึง A₅₁₉ นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader (SPECTROStar® Nano, Germany) โดยค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] ที่เหมาะสมจะอยู่ที่ประมาณ 0.7-0.9 ปรับความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์จนได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.9xx (ไม่เกิน 1) เลือกค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดไปใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ A₅₁₆

เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมของสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] แล้ว จากนั้นทำการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox เพื่อสร้างกราฟเส้นตรง ในการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะใช้เพลท 96 ช่อง ทำได้โดยปิเปตสารมาตรฐาน Trolox ตามด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] ในขั้นตอนสุดท้าย เริ่มจับเวลาเมื่อเติมสาร DPPH[•] ใน 5 ช่องแรก ดังภาพที่ 12 ปิดฝาเพลท บ่มในที่มืด 30 นาที จากนั้นเปิดฝาเพลทแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader (SPECTROStar® Nano, Germany)

	Sample					Blank					P	N
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Trolox con.10, 20 µl + DPPH 180 µl					Trolox con.10, 20 µl + Methanol 180 µl					Methanol 20 µl + DPPH 180 µl	Methanol 200 µl
B	Trolox con.15, 20 µl + DPPH 180 µl					Trolox con.15, 20 µl + Methanol 180 µl						
C	Trolox con.20, 20 µl + DPPH 180 µl					Trolox con.20, 20 µl + Methanol 180 µl						
D	Trolox con.25, 20 µl + DPPH 180 µl					Trolox con.25, 20 µl + Methanol 180 µl						
E	Trolox con.50, 20 µl + DPPH 180 µl					Trolox con.50, 20 µl + Methanol 180 µl						
F	Trolox con.75, 20 µl + DPPH 180 µl					Trolox con.75, 20 µl + Methanol 180 µl						
G	Trolox con.100, 20 µl + DPPH 180 µl					Trolox con.100, 20 µl + Methanol 180 µl						
H	Trolox con.125, 20 µl + DPPH 180 µl					Trolox con.125, 20 µl + Methanol 180 µl						

ภาพที่ 12 การเตรียมสารมาตรฐาน Trolox ในเพลทสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH[•] โดยเติมสารมาตรฐาน เมทานอล และสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] ลงในเพลท 96 ช่อง สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง Sample คือ สารมาตรฐานผสมกับสารอนุมูลอิสระ Blank คือ สารมาตรฐานผสมกับเมทานอล P (Positive control) คือ เมทานอลผสมกับสารอนุมูลอิสระ และ N (Negative control) คือ เมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์

ทำการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในเพลท โดยปิเปตสารสกัดที่เจือจางไว้ 4 เท่า ตามด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] ในขั้นตอนสุดท้าย เริ่มจับเวลาเมื่อเติมสาร DPPH[•] ใน 5 ช่องแรก ดังภาพที่ 13 ปิดฝาเพลทบ่มในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader (SPECTROStar® Nano, Germany)

	Sample					Blank					P	N
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	สารสกัด ตัวอย่าง 1, 20 μ l + DPPH 180 μ l					สารสกัด ตัวอย่าง 1, 20 μ l + Methanol 180 μ l					Methanol 20 μ l + DPPH 180 μ l	Methanol 200 μ l
B	สารสกัด ตัวอย่าง 2, 20 μ l + DPPH 180 μ l					สารสกัด ตัวอย่าง 2, 20 μ l + Methanol 180 μ l						
C	สารสกัด ตัวอย่าง 3, 20 μ l + DPPH 180 μ l					สารสกัด ตัวอย่าง 3, 20 μ l + Methanol 180 μ l						
D	สารสกัด ตัวอย่าง 4, 20 μ l + DPPH 180 μ l					สารสกัด ตัวอย่าง 4, 20 μ l + Methanol 180 μ l						
E	สารสกัด ตัวอย่าง 5, 20 μ l + DPPH 180 μ l					สารสกัด ตัวอย่าง 5, 20 μ l + Methanol 180 μ l						
F	สารสกัด ตัวอย่าง 6, 20 μ l + DPPH 180 μ l					สารสกัด ตัวอย่าง 6, 20 μ l + Methanol 180 μ l						
G	สารสกัด ตัวอย่าง 7, 20 μ l + DPPH 180 μ l					สารสกัด ตัวอย่าง 7, 20 μ l + Methanol 180 μ l						
H	สารสกัด ตัวอย่าง 8, 20 μ l + DPPH 180 μ l					สารสกัด ตัวอย่าง 8, 20 μ l + Methanol 180 μ l						

ภาพที่ 13 การเตรียมตัวอย่างในเพลทสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH[•] โดยเติมสารสกัด เมทานอล และสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] ลงในเพลท 96 ช่อง สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง Sample คือ สารสกัดผสมกับสารอนุมูลอิสระ Blank คือ สารสกัดผสมกับเมทานอล P (Positive control) คือ เมทานอลผสมกับสารอนุมูลอิสระ และ N (Negative control) คือ เมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์

5.3.5 การคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

รายงานผลในรูปของ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) หน่วยไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักเมสตีแห้ง (μ mole/gDW) แบ่งการคำนวณออกเป็น การคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox การสร้างสมการเส้นตรง และการคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

การคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการสร้างสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน

Trolox

เมื่อวัดค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox จะได้ค่าต่าง ๆ ประกอบด้วยช่อง Sample จำนวน 5 ซ้ำ (ช่อง 1-5) ของแต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 และ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช่อง A-H), Blank 5 ซ้ำ (ช่อง 6-10), Positive (11A-11E) และ Negative (12A-12E) อย่างละ 5 ซ้ำ จากนั้นเรียงค่าต่าง ๆ จากน้อยไปมาก เลือกค่าที่ใกล้เคียงกัน 3 ค่า นำมาวิเคราะห์ดังสมการ

$$\%DPPH \text{ inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่เจือจางผสมกับสารละลาย DPPH[•]

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH[•] ที่ไม่มีตัวอย่างของสารมาตรฐานโดยใช้เมทานอล 20 ไมโครลิตร แทนตัวอย่างของสารมาตรฐาน

หา A_{sample} ได้จากค่า Sample - Blank

A_{control} ได้จากค่าเฉลี่ยของ Positive - ค่าเฉลี่ยของ Negative

%DPPH inhibition หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครโมล (μmole) ดังนี้

$$\text{Trolox} = (\text{Conc.}) \times 20 \times 10^{-6} \times 10^{-3} \times 10^6 / 250.29$$

เมื่อ 20 = ปริมาตรตัวอย่างต่อหลอด

10^{-6} = เปลี่ยนหน่วยไมโครลิตร เป็น ลิตร (μL เป็น L)

10^{-3} = เปลี่ยนหน่วยมิลลิกรัม เป็น กรัม (mg เป็น g)

10^6 = หน่วยไมโครโมล (μmole)

250.29 = มวลโมเลกุลของสาร Trolox

ดังนั้น จากความเข้มข้นสารมาตรฐาน Trolox 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 และ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้สารมาตรฐาน Trolox เท่ากับ 0.0008, 0.00012, 0.00016, 0.00020, 0.00040, 0.00060, 0.00080 และ 0.01000 ไมโครโมล ตามลำดับ

สร้างกราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox ให้แกน x เท่ากับ ค่า Trolox (ไมโครโมล), แกน y เท่ากับ ค่า %DPPH inhibition เลือกค่า Trolox และค่า %DPPH inhibition อย่างน้อย 5 ค่า เพื่อสร้างสมการเส้นตรง $y = mx + c$ โดยค่า R^2 จะต้องไม่เกิน 1 และไม่ต่ำกว่า 0.9 จากนั้นนำสมการเส้นตรงที่ได้ไปคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

การคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

การคำนวณค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเหมือนกับการคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox เมื่อคำนวณได้ค่า %DPPH inhibition แล้วให้แทนค่า %DPPH inhibition ในสมการเส้นตรง $y = mx + c$ ที่ได้จากกราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox เพื่อหาค่า TEAC (ไมโครโมล)

กำหนดให้ x คือ TEAC (μmol)

y คือ %DPPH inhibition

แปลงหน่วยให้เป็นไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ($\mu\text{mol/gDW}$) ดังนี้

เมื่อ สารสกัด 800 ไมโครลิตร ได้มาจากผงเมล็ดข้าวบดละเอียด 0.1 กรัม

ใช้สารสกัดจำนวน 20 ไมโครลิตร ต่อ 1 ช่อง

จะได้ $(20 \text{ ไมโครลิตร} \times 0.1 \text{ กรัม}) / 800 \text{ ไมโครลิตร}$ เท่ากับ 0.0025 กรัม

ดังนั้น นำค่า TEAC ไมโครโมล ที่ได้ / 0.0025 กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง

เท่ากับหน่วยไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ($\mu\text{mol/gDW}$)

6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร F_2

นำจีโนไทป์ คือ เครื่องหมาย RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ของประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้โปรแกรม Minitab 18 วิเคราะห์ด้วยวิธี ANOVA ทดสอบแบบ Tukey เพื่อหาอิทธิพลความสัมพันธ์ และวิธี Pearson correlation เพื่อหาทิศทางและระดับความสัมพันธ์ จากนั้นนำเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์มาหาสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient); ($y = \alpha + \beta x$) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R Square; R^2) ด้วยการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) โดยวิธี Simple regression และ Multiple regression

กำหนดให้จีโนไทป์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย จำนวน 1 แถบ (KK) ให้คะแนนเป็น 2 จีโนไทป์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์ให้ก้าน้อย จำนวน 1 แถบ และพันธุ์รับปทุมธานี 1 จำนวน 1 แถบ (KP) ให้คะแนนเป็น 1 และจีโนไทป์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์รับจำนวน 1 แถบ (PP) ให้คะแนนเป็น 0

7. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร BC_1F_1

7.1 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าว ได้แก่ พันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และประชากร BC_1F_1 ทั้งหมดจำนวน 318 ต้น มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในเพลท 96 ช่อง ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเพลท 1 ช่อง เท่ากับ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอประมาณ 30-50 นาโนกรัม ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ 1x My Taq HS Red Mix (Bioline, USA) องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และสภาวะในขั้นตอนการทำพีซีอาร์เช่นเดียวกับการตรวจสอบเครื่องหมายในประชากร F_2 ในข้อ 5.1

วิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีสีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution เป็นส่วนประกอบ ความเข้มข้นเจลอะกาโรส 4 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5 TBE buffer (Tris-borate-EDTA) เย็น ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 10 นาที ถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวี ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอในประชากร BC_1F_1 จำนวน 300 ต้น ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ สังเกตแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยจะพบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 2 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1. (PP) แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับพันธุ์รับปทุมธานี 1 จำนวน 1 แถบ และแบบที่ 2. (KP) แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับพันธุ์รับปทุมธานี 1 (P) และพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) อย่างละ 1 แถบ

7.2. การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายชนิด SSR

การทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR*, และ *OsMYB3* ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 318 ต้น โดยนำข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอ (จีโนไทป์) กำหนดให้สัญลักษณ์

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนของพันธุ์รับปทุมธานี 1 และ

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนของพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1

ทดสอบไคสแควร์ (Chi-square) โดยใช้โปรแกรม Minitab 18 เพื่อศึกษาการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดกับยีน ว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่ ทำการวิเคราะห์การถ่ายทอด 1 เครื่องหมายต่อ 1 ยีน ของประชากร BC_1F_1 โดยมีสมมติฐานอัตราส่วนการกระจายตัวของเครื่องหมาย เท่ากับ 1KP: 1PP

7.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การเตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าว ประกอบด้วยพันธุ์ปทุมธานี 1, ก้าน้อย, ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1), และประชากร BC_1F_1 จำนวน 266 ต้น ทำการซังเมล็ดข้าวกล้อง ตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่มีเม็ดลูกปัด (stainless steel ball) จำนวน 3 เม็ด นำเข้าเครื่องตีตัวอย่างจนเมล็ดข้าวละเอียดมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ทำการวิเคราะห์ต่อตามขั้นตอนการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2 ในข้อ 5.3

7.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH Differential

เตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าว ประกอบด้วยพันธุ์ปทุมธานี 1, ก้าน้อย, ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร BC_1F_1 จำนวน 250 ต้น ทำการซังเมล็ดข้าวกล้องดังกล่าว ตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่มีเม็ดลูกปัด (stainless steel ball) จำนวน 3 เม็ด นำเข้าเครื่องตีตัวอย่างจนเมล็ดข้าวละเอียดมีลักษณะคล้ายผงแป้ง เติมสารละลายที่ประกอบด้วย ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ เมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าในที่มืดที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายส่วนใส ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ ปรับปริมาตรสารสกัดให้ได้ 1,500 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ pH 4.5 ทำได้โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยการซังสารโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.372 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH 1.0 ด้วย 1N HCl และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น สำหรับการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 ทำได้โดย ซังสารโซเดียมอะซิเตต ($CH_3CO_2Na \cdot H_2O$) ปริมาณ 10.88 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH 4.5 ด้วย 1N HCl และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การวัดปริมาณแอนโทไซยานินในเพลท 96 ช่อง ทำได้โดย ปิเปตสารสกัดที่เตรียมไว้ลงในเพลท จำนวน 20 ไมโครลิตร ต่อ 1 ช่อง เจือจางตัวอย่างสารสกัด โดยใช้สารสกัดต่อสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5 (สารสกัด 1 ส่วน ต่อ สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4 ส่วน) ดังภาพที่ 14 ปิดฝาเพลท บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร (A_{520} และ A_{700}) นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (SPECTROStar® Nano, Germany) โดย 1 เพลทจะสามารถวัดปริมาณแอนโทไซยานินได้จำนวน 15 ตัวอย่าง ให้ทำเช่นนี้ไปจนครบทุกตัวอย่างที่ต้องการสกัด

	pH = 1.0						pH = 4.5					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KNO R1	KNO R2	KNO R3	PTT1 R1	PTT1 R2	PTT1 R3	KNO R1	KNO R2	KNO R3	PTT1 R1	PTT1 R2	PTT1 R3
B	F ₁ R1	F ₁ R2	F ₁ R3	1 R1	1 R2	1 R3	F ₁ R1	F ₁ R2	F ₁ R3	1 R1	1 R2	1 R3
C	2 R1	2 R2	2 R3	3 R1	3 R2	3 R3	2 R1	2 R2	2 R3	3 R1	3 R2	3 R3
D	4 R1	4 R2	4 R3	5 R1	5 R2	5 R3	4 R1	4 R2	4 R3	5 R1	5 R2	5 R3
E	6 R1	6 R2	6 R3	7 R1	7 R2	7 R3	6 R1	6 R2	6 R3	7 R1	7 R2	7 R3
F	8 R1	8 R2	8 R3	9 R1	9 R2	9 R3	8 R1	8 R2	8 R3	9 R1	9 R2	9 R3
G	10 R1	10 R2	10 R3	11 R1	11 R2	11 R3	10 R1	10 R2	10 R3	11 R1	11 R2	11 R3
H	12 R1	12 R2	12 R3	Blank			12 R1	12 R2	12 R3			

ภาพที่ 14 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดในเพลท 96 ช่อง สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน ตัวอักษร R1, R2 และ R3 คือ ซ้ำที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ, KNO คือ ก้าน้อย, PTT1 คือ ปทุมธานี 1, F₁ คือ เมล็ดบนต้น F₁ และตัวเลข 1 ถึง 12 คือ ตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดบนต้นของประชากร BC₁F₁ ต้นที่ 1 ถึง 12, pH = 1.0 และ pH = 4.5 คือ สารสกัดในเพลทที่ใช้เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ 4.5 ตามลำดับ, Blank คือ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ชุดควบคุม)

คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินในหน่วย มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง (มก./100 ก.เมล็ดแห้ง) จากสูตร คือ Anthocyanin pigment (cyanidin-3-glucoside equivalents, mg/L) = $(A \times MW \times DF \times 10^3) / \epsilon \times 1$

$$\text{โดยที่ } A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{ pH } 1.0 - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{ pH } 4.5$$

$$MW \text{ (molecular weight)} = 449.2 \text{ กรัมต่อโมล (g/mol)}$$

$$DF = (\text{dilution factor} = 1)$$

$$\epsilon = 26,900 \text{ molar extinction}$$

ทำการเปลี่ยนหน่วยจาก มิลลิกรัม ให้เป็น 100 กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง ดังนี้

$$A/(\text{น้ำหนักแห้ง}/1,000) \text{ หน่วย mg/L/gDW}$$

$$\times 0.0015 \text{ ลิตร (ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดที่ได้ 1.5 ml) หน่วย mg/gDW}$$

$$\times 100 \text{ เปลี่ยนหน่วยเป็น mg/100gDW}$$

7.5 วิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด

ศึกษาข้อมูลโดยบันทึกฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 ข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย และประชากร BC₁F₁ จำนวน 277 ต้น

8. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฟีโนไทป์ ในประชากร BC₁F₁

นำจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ของประชากร BC₁F₁ จำนวน 321 ต้น มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยใช้โปรแกรม Minitab 18 มาวิเคราะห์ด้วยวิธี ANOVA ทดสอบแบบ Tukey เพื่อหาความอิทธิพลความสัมพันธ์ และวิธี Person correlation เพื่อหาทิศทางและระดับความสัมพันธ์ จากนั้นนำเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์มาหาสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient); ($y = \alpha + \beta x$) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R Square; R^2) ด้วยการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) โดยวิธี Simple regression และ Multiple regression

กำหนดให้จีโนไทป์ที่เหมือนพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์ให้ก้าน้อย อย่างละ 1 แถบ (KP) ให้คะแนนเป็น 1 และจีโนไทป์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ปทุมธานี 1 จำนวน 1 แถบ (PP) ให้คะแนนเป็น 0 ส่วนของสีเยื่อหุ้มเมล็ด กำหนดให้ เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวให้คะแนนเป็น 0 เยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลถึงดำ ให้คะแนนเป็น 1 และเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดงให้คะแนนเป็น 2

9. การคัดเลือกต้น BC₁F₁ และผลิตเมล็ด BC₂F₁

9.1. การคัดเลือกต้น BC₁F₁ ที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ของทุกเครื่องหมาย และตรวจสอบด้วยเครื่องหมายที่خابอีกข้างหนึ่งของยีน

การคัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ทุกเครื่องหมาย จากการวิเคราะห์จีโนไทป์จากแถบดีเอ็นเอ ในข้อ 7.1 คัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ของทุกเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR*, และ *OsMYB3*

ตรวจสอบจีโนไทป์ของต้นคัดเลือกจากประชากร BC₁F₁ ด้วยเครื่องหมายที่อยู่خابอีกข้างหนึ่งของตำแหน่งยีน

เมื่อวิเคราะห์จีโนไทป์และคัดเลือกต้นข้าวด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR*, และ *OsMYB3* คือ เครื่องหมาย RM17321 RM11383 และ RM15209 ตามลำดับเสร็จแล้ว จากนั้นตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่خابอยู่อีกข้างหนึ่งของแต่ละยีน คือ

เครื่องหมาย RM2441, RM7419 และ RM15217 ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR*, และ *OsMYB3* ตามลำดับ เพื่อยืนยันการมีอยู่ของยีนที่ได้มาจากพันธุ์ให้ก้าน้อยในต้นที่คัดเลือกจากประชากร BC_1F_1

9.2 การผลิตเมล็ดข้าวผสมกลับครั้งที่ 2 ช่วงที่ 1 (BC_2F_1)

เมื่อทำการวิเคราะห์จีโนไทป์และคัดเลือกต้นข้าวจากประชากร BC_1F_1 ที่มีจีโนไทป์ของทุกเครื่องหมายที่เป็นแบบ heterozygous (KP) จากนั้นทำการแยกกอข้าวจากต้นคัดเลือกประมาณ 5 กอต่อต้น ปลุกกล่อละ 1 กระถาง ผสมกลับไปยังพันธุ์รับปทุมธานี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1 ในฤดูนาปี 2563

9.3 การวิเคราะห์ฟีโนไทป์ของต้นคัดเลือก BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้

ศึกษาข้อมูลโดยบันทึกฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 ข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย ลูกผสมช่วงที่ 1 (F_1) และต้นคัดเลือก BC_1F_1 ที่มีจีโนไทป์ของทุกเครื่องหมายเป็นแบบ heterozygous (KP) จำนวน 15 ต้น นอกจากนี้ยังมีการบันทึกฟีโนไทป์ทางสัณฐานวิทยาอื่น ๆ ได้แก่ สีของกาบใบ เขียวกันแมลง เยื่อกันน้ำฝน ปลายกลีบดอกใหญ่ และยอดเกสรเพศเมีย

สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล อาคารจุฬาภรณ์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2. โรงเรือนกระจก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 24 เดือน เริ่มตั้งแต่ เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2562 ถึง เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2564

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาพันธุ์ข้าว และสร้างประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ช่วงที่ 1 (BC_1F_1)

จากการศึกษาและคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้เมล็ดข้าวมีแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยศึกษาข้าวพันธุ์ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีชาว มีคุณภาพหุงต้มดี กลิ่นหอมอ่อน ทำให้รับประทานง่าย ใช้เป็นพันธุ์รับ (ต้นแม่) คือ พันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นข้าวเจ้า ไม้ไวต่อช่วงแสง ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ BKNA6-18-3-2 กับสายพันธุ์ PTT85061-86-3-2-1 ที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี คัดเลือกจนได้สายพันธุ์ PTT90071-93-8-1-1 (กรมการข้าว, 2564) และใช้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เป็นพันธุ์ให้ (ต้นพ่อ) คือ พันธุ์ก้าน้อย เป็นข้าวเหนียวนาปี แหล่งที่มา จากกลุ่มอาสาสมัคร อนุรักษ์พัฒนา และปรับปรุงพันธุ์กรรมข้าวพื้นบ้าน ต.กำแมด อ.กุดชุม จ.ยโสธร (รัชนิ และ ธิญ, 2553)

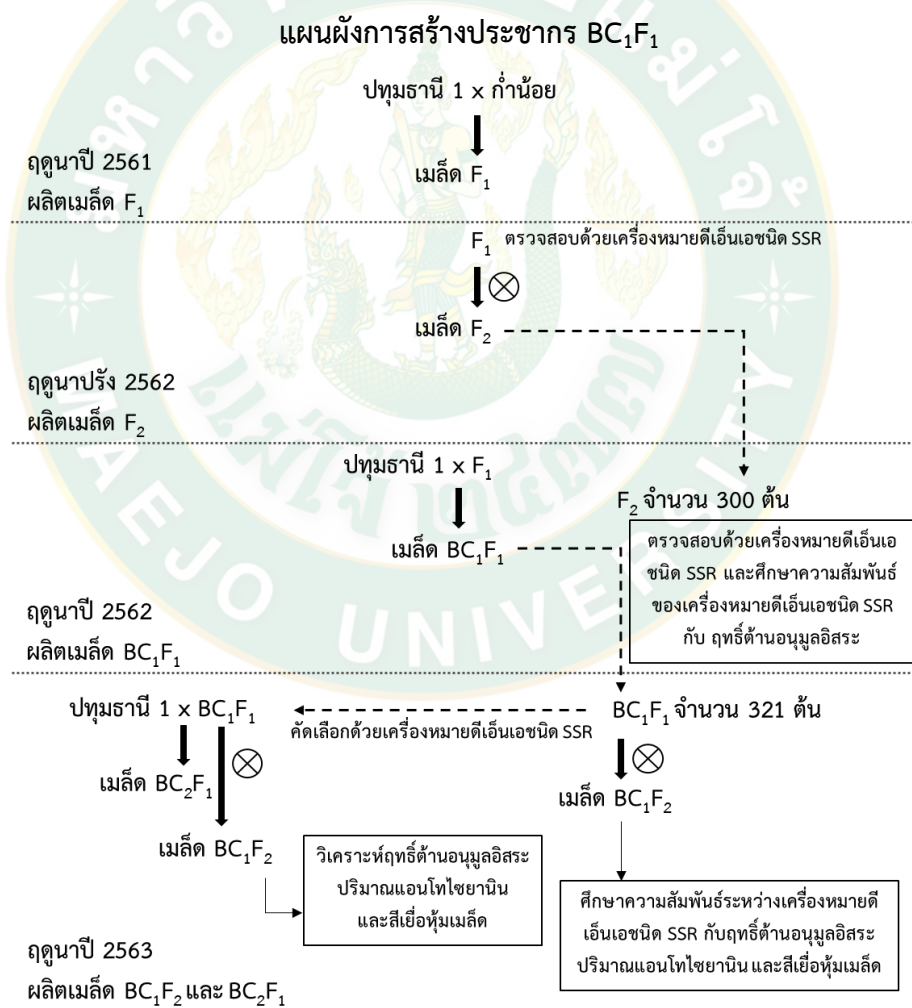
ผลิตเมล็ดข้าวลูกผสมช่วงที่ 1 (F_1) ในฤดูนาปี 2561 (กรกฎาคม – ธันวาคม) ปลุกเพื่อผลิตเมล็ด F_2 ในฤดูนาปรัง 2562 (มกราคม – มิถุนายน) สร้างประชากร F_2 ในฤดูนาปี 2562 (กรกฎาคม – ธันวาคม) จำนวน 300 ต้น จากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ใช้เป็นพันธุ์รับ กับก้าน้อยที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จากงานวิจัยของ น.ส.อนงค์นาฏ หรีจันดา (อนงค์นาฏ, 2564)

การผลิตเมล็ดข้าวผสมกลับครั้งที่ 1 ช่วงที่ 1 (BC_1F_1) ของคู่ผสมระหว่าง ข้าวพันธุ์รับ คือ ปทุมธานี 1 (PTT1) และข้าวพันธุ์ให้ คือ F_1 ในฤดูนาปี พ.ศ. 2562 (กรกฎาคม-ธันวาคม) ได้เมล็ด BC_1F_1 จำนวน 1,173 เมล็ด เพาะเมล็ด BC_1F_1 และปลุกเพื่อสร้างประชากร BC_1F_1 ทั้งหมด จำนวน 321 ต้น ในฤดูนาปี พ.ศ. 2563 (กรกฎาคม-ธันวาคม) (ภาพที่ 15) คัดเลือกต้น BC_1F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ทุกเครื่องหมาย เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_2

เก็บเมล็ดบนต้น BC_1F_1 (BC_1F_2 seeds) เพื่อนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จำนวน 266 ต้น วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน จำนวน 250 ต้น และวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด จำนวน 277 ต้น อย่างไรก็ตาม ต้น BC_1F_1 บางต้นไม่สามารถเก็บเมล็ดได้ หรือเก็บเมล็ดได้จำนวนน้อยไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน เนื่องจากถูกศัตรูพืชเข้าทำลายอย่างต่อเนื่อง เช่น หนู เพลี้ย และด้งแตน โดยแผนผังการสร้างประชากร BC_1F_1



ภาพที่ 15 ประชากร BC_1F_1 ที่ปลูกในโรงเรือน จำนวน 321 ต้น
ในฤดูนาปี พ.ศ. 2563 (กรกฎาคม-ธันวาคม)

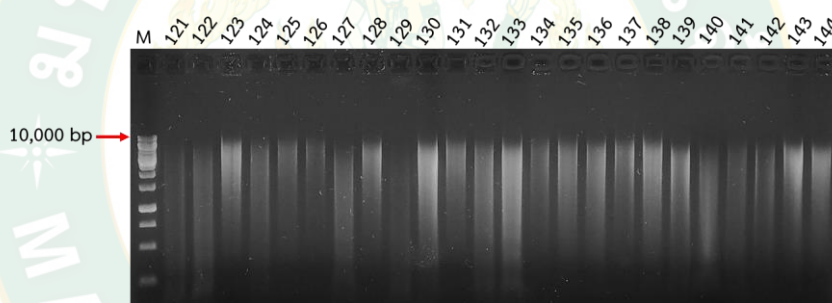


ภาพที่ 16 แผนผังการสร้างประชากร BC_1F_1 และผลิตเมล็ด BC_2F_1 ของคู่ผสมระหว่าง
ข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้ F_1

2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว

2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เฟลท 96 ช่อง

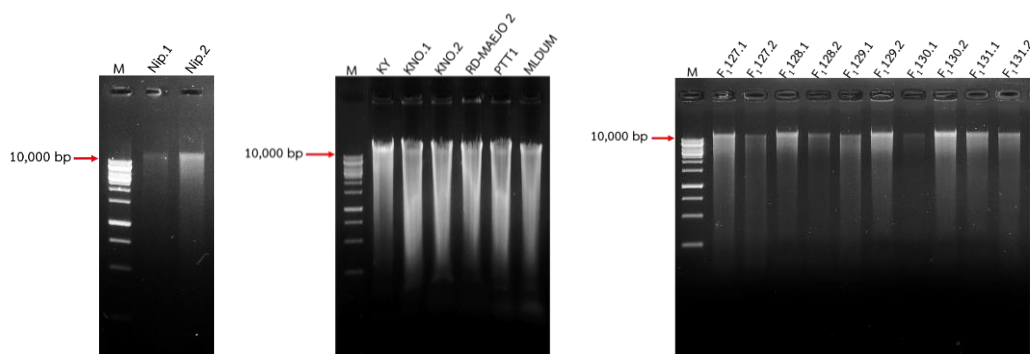
การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น แบ่งออกเป็น สกัดโดยใช้เฟลท จำนวน 288 ต้น (3 เฟลท) และสกัดโดยใช้หลอด จำนวน 12 ต้น (ต้นที่ 289-300) พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้เกือบทุกตัวอย่าง โดยดีเอ็นเอเกิดการแตกหักและมีลักษณะเป็นแถบป็น (smear) เกือบทุกตัวอย่าง แต่สามารถนำดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในขั้นตอนต่อไปได้ (ภาพที่ 17) และมีบางตัวอย่าง คือ ต้นที่ 15, 22, 100, 107, 174 และ 193 ไม่พบแถบดีเอ็นเอ จึงทำการทดสอบโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลซ้ำอีกครั้ง ผลปรากฏว่า พบแถบดีเอ็นเอต้นที่ 100 และ 174 เท่านั้น สำหรับต้นที่ 193 แถบดีเอ็นเอจางมาก ส่วนต้นที่ 15, 22 และ 107 ไม่พบแถบดีเอ็นเอ จึงทำการสกัดดีเอ็นเอต้นที่ 15, 22, 107 และ 193 ใหม่ โดยใช้หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร พร้อมกับการสกัดดีเอ็นเอของต้นที่ 289-300 ในขั้นตอนที่ 2.2



ภาพที่ 17 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 บางส่วน จากทั้งหมด 288 ต้น
ตัวเลข 121 - 144 คือ ต้นที่ 121 -144, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

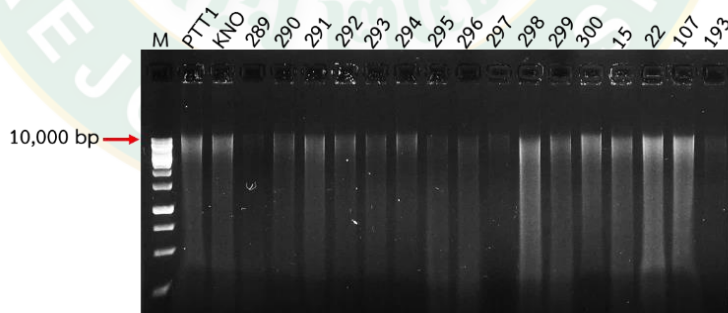
2.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

การสกัดดีเอ็นเอของข้าว ได้แก่ พันธุ์ Nipponbare, กข-แม่โจ้ 2, กำแพง, มะลิดำ, พันธุ์รับพุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และลูกผสม F_1 คือ ต้นที่ 127-131 พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง และแถบดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอและมีลักษณะเป็นแถบป็น (smear) เล็กน้อย (ภาพที่ 18)



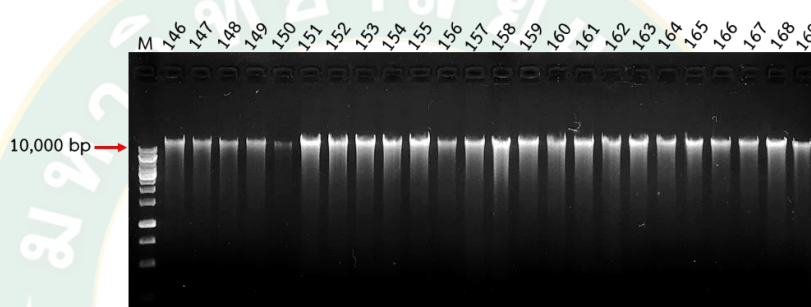
ภาพที่ 18 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ M คือ แลบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder, Nip.1 และ Nip.2 คือ พันธุ์ Nipponbare ข้าที่ 1 และ 2 ตามลำดับ, KY คือ กำใหญ่, KNO.1 และ KNO.2 คือ กำน้อย ข้าที่ 1 และ 2 ตามลำดับ, RD-MAEJO 2 คือ กข-แม่โจ้ 2, PTT1 คือ ปทุมธานี 1, MLDUM คือ มะลิดำ และ F₁127.1 -F₁131.1 คือ ลูกผสม F₁ ต้นที่ 127-131 ข้าที่ 1 ตามลำดับ F₁127.2 -F₁131.2 คือ ลูกผสม F₁ ต้นที่ 127-131 ข้าที่ 2 ตามลำดับ

การสกัดดีเอ็นเอของประชากร F₂ ต้นที่ 289-300, ต้น F₂ ที่สกัดดีเอ็นเอไม่ได้จากขั้นตอนที่ 2.1 คือ ต้นที่ 15, 22, 107 และ 193 รวมทั้งพันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้กำน้อย พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอและมีลักษณะเป็นแถบป็น (smear) เล็กน้อย (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F₂ ทั้งหมด 12 ต้น ตัวเลข 289 -300 คือ F₂ ต้นที่ 289 - 300 และตัวเลข 15, 20, 107 และ 193 คือ ต้นที่ 15, 22, 107 และ 193 ตามลำดับ, PTT1 คือ พันธุ์ปทุมธานี 1, KNO คือ พันธุ์กำน้อย และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

การสกัดดีเอ็นเอของประชากร BC₁F₁ จำนวน 321 ต้น พบว่า แอบดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่เกือบทุกต้น เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอและมีลักษณะเป็นแถบป็น (smear) เล็กน้อย (ภาพที่ 20) นอกจากนี้พบจำนวน 29 ต้น ได้แก่ ต้นที่ 15, 24, 32, 41, 57, 69, 71, 72, 79, 86, 99, 139, 227, 230, 232, 233, 275, 277, 284, 285, 300, A151, A153, A159, A162, J352, J354, J357 และ J358 ที่ไม่พบแอบดีเอ็นเอหรือบางต้นพบแอบดีเอ็นเอแต่จางมาก จึงได้ทำการสกัดดีเอ็นเอใหม่ พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ และแอบดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ ยกเว้นต้นที่ 138, 187 และ 274 ไม่ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอเนื่องจากถูกศัตรูพืช (หนู) เข้าทำลายตั้งแต่ระยะต้นกล้า ดังนั้นดีเอ็นเอที่สกัดได้ของประชากร BC₁F₁ มีทั้งหมดจำนวน 318 ต้น



ภาพที่ 20 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร BC₁F₁ บางส่วน จากทั้งหมด 318 ต้น
ตัวเลข 146 - 169 คือ ต้นที่ 146 - 169, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

3. การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* บนโครโมโซมที่ 4, 1 และ 3 ตามลำดับ โดยคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอในตาราง Supplementary table 18 จากฐานข้อมูลพันธุ์กรรมข้าว Gramene ที่ใกล้กับตำแหน่งยีน และขนานข้างยีนทั้งสองด้าน โดยคัดเลือกเครื่องหมายที่มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ ประมาณ 100 ถึง 300 คู่เบส และอยู่ใกล้กับตำแหน่งยีน พบว่า ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* จำนวน 22, 24 และ 22 เครื่องหมาย ตามลำดับ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* มีระยะห่างกับตำแหน่งยีน อยู่ระหว่าง 31,490 ถึง 1,643,619 คู่เบส (31 - 1,643 กิโลเบส) (ตารางที่ 2) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* มีระยะห่างกับตำแหน่งยีน อยู่ระหว่าง 17,242 ถึง 3,482,643 คู่เบส (17 - 3,482 กิโลเบส) (ตารางที่ 3) และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3* มีระยะห่างกับตำแหน่งยีน อยู่ระหว่าง 25,095 ถึง 2,800,041 คู่เบส (25 - 2,800 กิโลเบส) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* จำนวน 22 เครื่องหมาย

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ ชนิด SSR	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	ตำแหน่ง เครื่องหมาย บนโครโมโซม (คู่เบส)	ระยะห่างของ เครื่องหมาย จากตำแหน่ง ยีน (คู่เบส)	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์ของ Nipponbare (คู่เบส)
1	RM1354/	F_TCGTTGGTCCAAGCTCACACG	26,272,526	1,643,619	173
	RM17261	R_GGCCGGCAAAGGTATCTGTCTG	26,272,571		
2	RM17312	F_GAGTTGAAGCACGAAGCATTGTCTG	27,476,243	439,928	152
		R_CTCGCCATTGCCCTCACAACC	27,476,262		
3	RM17313/	F_CGATGATCATGCCGTTCTTTGG	27,477,997	438,170	188
	RM6589	R_AACCCGCAAAGTTCACAACACG	27,478,020		
4	RM17314/	F_CAATCTGGAGGCACTGTCACG	27,516,234	399,929	149
	RM3288	R_AGTGACAAGATGAAGCCAACAGC	27,516,261		
5	RM17315/	F_AGTCCAAAGATGGCAACACAAGC	27,541,237	374,930	193
	RM6454	R_ACCGGAAGAGGAGGTTGTAGTCC	27,541,260		
6	RM17317/	F_CACACCAACTTCTCGCGGTAAACG	27,623,896	292,267	157
	RM7187	R_CACAGCGAACGTGGTGTCTTCG	27,623,923		
7	RM3092/	F_CTTGGGTACGTCATCCGTGTATGG	27,691,640	224,507	315
	RM17320	R_AAATACCCGTGTGTTGCAAGTGG	27,691,683		
8	RM17321	F_AAAGACAACCGTGAGGCTAGTGG	27,697,771	218,398	228
		R_CGATGATGTACATGGGCACTCC	27,697,792		
9	RM17322/	F_TCTGCTAGCCTGCACACAGAAGG	27,782,214	133,937	95
	RM3820	R_GCACAGGAGACCAAAGAATCAGG	27,782,253		
10	RM17323	F_TTGGGCTACGGACGCTCTCTCG	27,796,450	119,721	188
		R_AGCCCGAATCTCAAAGCGTCAGC	27,796,469		
11	RM17324	F_TGATCACACTTATCCACGTCAAGC	27,839,532	76,638	129
		R_GAGTGGCATTCTCTGCTCTGC	27,839,552		
ตำแหน่งยีน OsB2 บนโครโมโซมที่ 4 (27,916,190 ถึง 27,916,850) ตำแหน่งยีน OsB1 บนโครโมโซมที่ 4 (27,948,854 ถึง 27,956,890)					
12	RM17327/	F_GTACAAGCAAACGCTTCCCAAGG	27,988,340	31,490	194
	RM5320	R_ACGACATGTGCCGGTAGATCAGG	27,988,363		
13	RM2441/	F_CGCTGCCATCATCTACAACAGG	28,020,850	64,000	390
	RM17329	R_CAACAAATGCTACCTACCATGC	28,020,903		

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ ชนิด SSR	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	ตำแหน่ง เครื่องหมาย บนโครโมโซม (คู่เบส)	ระยะห่างของ เครื่องหมาย จากตำแหน่ง อื่น (คู่เบส)	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์ของ Nipponbare (คู่เบส)
14	RM17330	F_GGCGGTTCTTATATTAGCCTCATGC R_CCTCACAAAGATGCCACGAAGC	28,124,933 28,124,964	168,083	297
15	RM17332	F_CGGTACATCACGGTATCAAATCG R_TAAATGCTGGAGCGATGCTAACC	28,128,458 28,128,485	171,608	166
16	RM17335	F_GCGACAGGAAGCAGTGGAAAGC R_TCTCTTCTCTGCCGCGAATCC	28,158,436 28,158,456	201,586	300
17	RM17337/ RM470	F_CCCTCCCGTAGACCTTGTACCC R_CCACAGCTAACCAATCCTTCTCC	28,248,941 28,248,982	292,091	299
18	RM17340	F_TTACCTTCTTGGAGGCCTTCTCC R_GGATTCTTTGGTTGGTGTCTTCG	28,278,310 28,278,330	321,460	97
19	RM17342	F_GTCTCCTGCAGTGGCCTCAACC R_AAGTCGCGCGTTAGCCTGTCG	28,284,300 28,284,320	387,450	252
20	RM17344	F_CCGAGAATAACTCCGGGATAAGC R_ATGGTCCCGTCTCTGTCTCTCC	28,373,770 28,373,795	416,920	118
21	RM17346	F_CAGCTGCAAACACAACATTGAGC R_TGATCCCTCTACTCGACCTCTGC	28,387,108 28,387,128	430,258	292
22	RM17347	F_GATCGCGTCAGAGGTACTTAGCC R_CCTTGTTGTTTTCCAATTCTAGGC	28,393,001 28,393,020	436,151	205

ตารางที่ 3 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* จำนวน 24 เครื่องหมาย

ลำดับ ที่	เครื่องหมายดี เอ็นเอชนิด SSR	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	ตำแหน่ง เครื่องหมาย บนโครโมโซม (คู่เบส)	ระยะห่างของ เครื่องหมายจาก ตำแหน่งยีน (คู่เบส)	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์ของ Nipponbare (คู่เบส)
1	RM7405/ RM11204	F_CCCATATATAGGAGGAGGAAGG R_AGTCAGTCATCACTGGTAGTCG	21,899,261 21,899,292	3,482,643	100
2	RM8144/ RM11272	F_TAGGGTGTCTATCAGGTGAGG R_TTACTACATAGCTACTCCCTCTGTCC	23,206,225 23,206,286	2,175,649	265
3	RM8129/ RM11370	F_CTCAACCCGGCTTTCCATCTCG R_GCTGCAGAGTCTCGCACGTTCC	25,067,420 25,067,465	314,470	187
4	RM11371	F_GGAGCAGAGGATGGCGTTGTCC R_GATTAACGCTCCCACGCCTCTTCC	25,071,119 25,071,139	310,796	327
5	RM8130/ RM11375	F_CCATTTAGCATCTAAGGGCTCTTTCC R_TGTGGTAGGACTTCTCCGTATTGG	25,111,742 25,111,769	270,166	374
6	RM11377	F_AAACCTAACTCAGTGTCCCAGTCG R_GGTGTCCTGATGATGATTACCC	25,158,971 25,159,000	222,935	371
7	RM11379	F_GGCGTGACGGATATTTCTTTCTCC R_GCTCTCGTCATCGACGCTACTGC	25,187,455 25,187,475	194,460	300
8	RM11380	F_GCCAACGCCGCATATAACACC R_CACGTCAACCAATCCACTACCC	25,223,275 25,223,294	158,641	266
9	RM11381	F_CTAGCGGATGAAGTGATGAGACG R_GCTGGTGGACGTTACTGTGTGC	25,271,947 25,271,966	109,969	169
10	RM11383	F_CTCTCCTTCACTTCTCCCTGATCC R_AGCAATGGCGATGGAAGTAACG	25,278,146 25,278,169	103,766	124
11	RM11392	F_CAAGTAGGCATGTTTCAACTGG R_GGATTTGTTTCTCTGCCAAGC	25,350,602 25,350,627	31,308	299
12	RM11396	F_CCCGCAGTAAGGAACACATCC R_TATGGTCCAGGAACGACTTGAGC	25,364,673 25,364,693	17,242	167
ตำแหน่งยีน <i>OsDFR</i> บนโครโมโซมที่ 1 (25,381,935 ถึง 25,385,548)					
13	RM11397	F CTCCTCCTTCCCTCTTTCCATGC R GTCACCAGTGACGGAGAGAGTCG	25,484,268 25,484,294	98,720	241

ลำดับ ที่	เครื่องหมายดี เอ็นเอชนิด SSR	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	ตำแหน่ง เครื่องหมาย บนโครโมโซม (คู่เบส)	ระยะห่างของ เครื่องหมายจาก ตำแหน่งยีน (คู่เบส)	ขนาดผลผลิตพีซี อาร์ของ Nipponbare (คู่เบส)
14	RM11404	F_GGAGAGCGTCGATGAGATGAGG R_CATGAGGGCATTGATACTTCAGG	25,712,353 25,712,374	326,805	298
15	RM11407	F_TGATTAAGGGTAGGTACCAGAGTGC R_GCAGCATACATCCCTCCTTAGC	25,849,534 25,849,561	434,212	271
16	RM11409	F_AGGGCCTTATATCAAGACACATGC R_CCACGAACACTCGCATACCC	25,870,356 25,870,423	484,808	216
17	RM11410	F_CATAACCCTGAAGTGGTGTGACG R_GTGCTTGATGATATGGTCCTTGC	25,876,285 25,876,304	490,737	148
18	RM11412	F_CCCATGGTCCAAGCCTAAAGC R_CGCCACAAAGCATGCAAATACC	25,979,003 25,979,046	593,455	183
19	RM3475/ RM11417	F_ATGTTGTCGAGTCGTGGTAATGC R_TATTCCTCGGTGTATGGGTCTCC	26035846 26035889	650,298	185
20	RM11423	F_TTGATTGGGACCTCTCACATGG R_TTCCTTCTGGTCTCTGTCACTGG	26125593 26125628	740,045	209
21	RM7318/ RM11425	F_GATTCCATAGCTGCGTGATTCTCC R_AGATGAACTGGCACGTGTGTCCG	26136814 26136837	751,266	107
22	RM11427	F_CCGTCATTGTCAAACACCTTAAGTCC R_TCATATGTAGCAGTGACATGGTGTCC	26193253 26193300	807,705	257
23	RM3440/ RM11467	F_TCCATTCCATTACCATCATCC R_ATCAAACGACGGTGTTCGAAGG	27185061 27185098	1,799,513	191
24	RM7419/ RM11497	F_CGGGTCAGTGAGAGGAGAGAGG R_GGTTCTGCTCCCTGTAGTCTGC	27695603 27695626	2,310,055	187

ตารางที่ 4 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3* จำนวน 22 เครื่องหมาย

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ ชนิด SSR	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	ตำแหน่ง เครื่องหมาย บนโครโมโซม (คู่เบส)	ระยะห่างของ เครื่องหมาย จากตำแหน่งยีน (คู่เบส)	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์ของ Nipponbare (คู่เบส)
1	RM15008	F_CGAGGGAGAGAAAGTGAGCTTCC R_CAAGATGTCCCATCGTCAACC	14,079,382 14,079,403	2,800,041	134
2	RM15139	F_CTCTACTTTCCATTAGCGAGAGG R_CAAATAAGATTGGCCACCTAGC	15,731,737 15,731,756	1,147,688	97
3	RM15191	F_CCTACCTGTCATTCCGTCAATCC R_AAGCTGGAGCTGTGGACTACTGG	16,555,795 16,555,826	323,618	198
4	RM15196	F_GATAGATGGCTGGATCATCG R_TAGTCTTCTGCACATCCATCG	16,644,749 16,644,768	234,676	95
5	RM15197	F_AGCTCTTCTTGGCCTGAACG R_TGTGCTCCTACATGTATTGACTGTGG	16,668,498 16,668,518	210,926	95
6	RM15198/ RM7403	F_GTAAAGTACGTACGCGGATGTGG R_GAGATACATGAGCAGAGGCAGAGG	16,668,932 16,668,955	210,489	234
7	RM15200/ RM6881	F_CGACTGATTGATTCCACAATGATCC R_GCAGCTGGAAGCAGAGGAAGACG	16,685,678 16,685,710	193,734	185
8	RM15201	F_CGGAGTTTGGCTGATTAGAACG R_TTGATAGGACTGCTTTGCTCTGC	16,688,823 16,688,844	190,600	182
9	RM15202	F_GATCGATCGCCTACAAACAATGC R_AGACGTGTCTCCTGCTCTCTGC	16,689,532 16,689,551	189,893	100
10	RM15206	F_CATTTCTTTGCCCTCGATCTTTCC R_AAGCGCCATAATCCAGGAACC	16,771,225 16,771,250	108,194	194
11	RM15207/ RM6283	F_GATCAGGTGGTCGGTTCTTACC R_CCTGTTGGAGACTGAGCTGATGC	16,775,927 16,775,950	103,494	100
12	RM15209	F_ACGAGAAGAACAACACGGTGACG R_TTCTTGATCATCTCCGGCTTTCC	16,854,329 16,854,349	25,095	238
ตำแหน่งยีน <i>OsMYB3</i> บนโครโมโซมที่ 3 (16,879,444 ถึง 16,880,495)					
13	RM15214	F_GGAGTAGTAAAGCGAAGCAGTAGC R_GGAGTCCCTCTTTCTCTTTGG	17,071,848 17,071,867	191,353	168
14	RM3400/ RM15215	F_GGGTGACCTTTGTATCTGTGC R_TGACAGAGGTAAAGCAGCAGTAGTCG	17,072,066 17,072,099	191,571	232

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ ชนิด SSR	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	ตำแหน่ง เครื่องหมาย บนโครโมโซม (คู่เบส)	ระยะห่างของ เครื่องหมาย จากตำแหน่งยีน (คู่เบส)	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์ของ Nipponbare (คู่เบส)
15	RM15216	F_CTCTTTGCGGCATGGGAGTAGC R_GTAACATGTCCTTGATGGCGAAGG	17,091,744 17,091,767	211,249	175
16	RM15217/ RM6914	F_AAGAACCCACCTGCGGTTAGC R_CTACAGCTTTCTTGATTGCTTGG	17,098,286 17,098,357	217,791	170
17	RM15218	F_CATGGATTAGCTCCCTCAATTAGC R_GCATATTCACCCTCCCTCTACG	17,100,648 17,100,699	220,153	221
18	RM15221	F_AGCGCAGCTCTTCCTCGTGAGC R_GGCATGGGCAACAAGTAGGG	17,206,179 17,206,202	325,684	293
19	RM15222	F_TAGTTACGATAATGCGGTGGAGTGG R_TGGAGCCACGGGTAAAGTCTAGC	17,219,073 17,219,094	338,578	179
20	RM15223	F_CAACTGTCCTGGAGCCCTAGC R_GTTGCAGTCAATCCATCAGTCG	17,220,906 17,220,943	340,411	185
21	RM15225	F_CTCCCTCCACCAAGTCGTCATGC R_CGAGCGAGAGGAAAGCCTGAGC	17,262,596 17,262,616	382,101	276
22	RM15226	F_CCCTACACTACGCTCACAACAAACG R_TAGAGCGCCGATATCCCGAAGC	17,264,450 17,264,501	383,955	197

4. การทดสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ พันธุ์รับ พันธุ์ให้ และลูกผสม F_1

4.1 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ

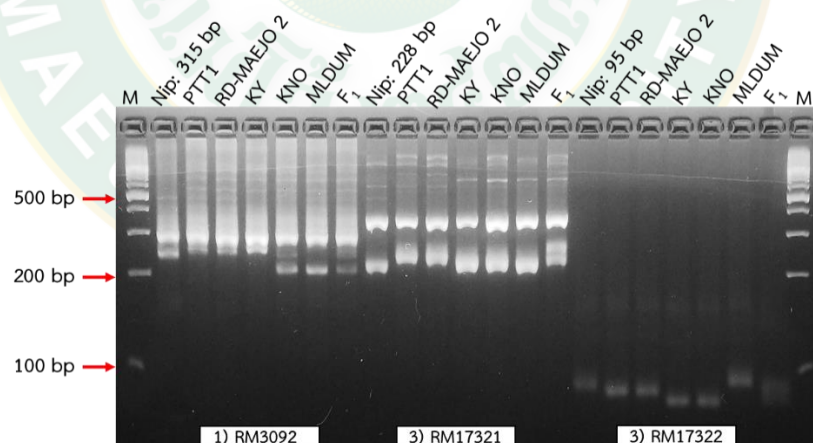
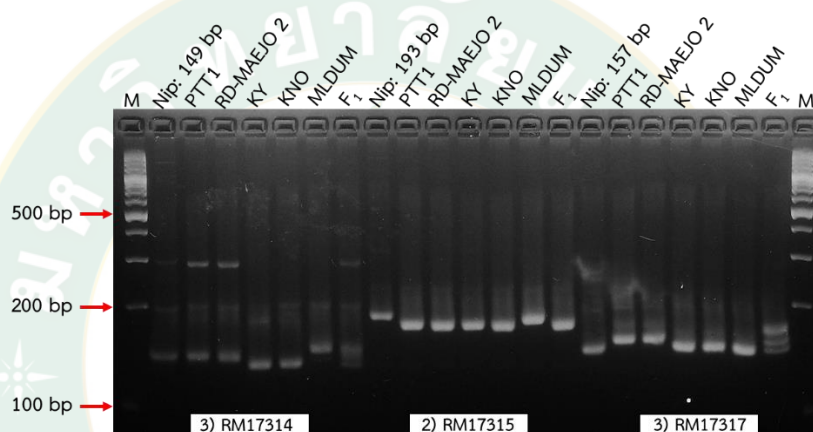
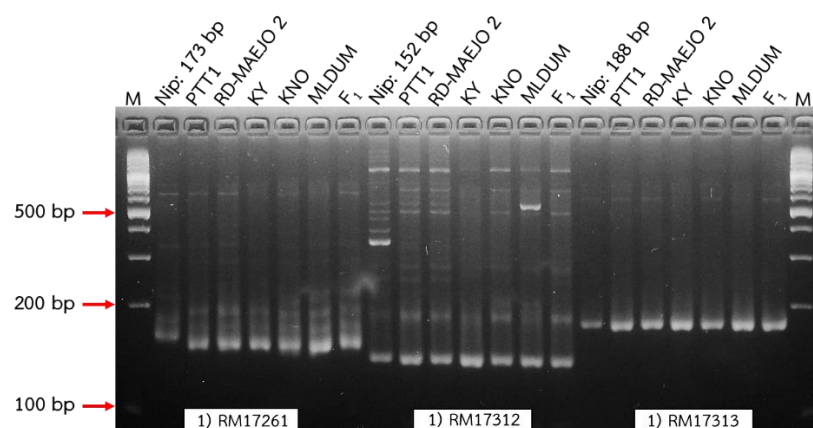
4.1.1 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*

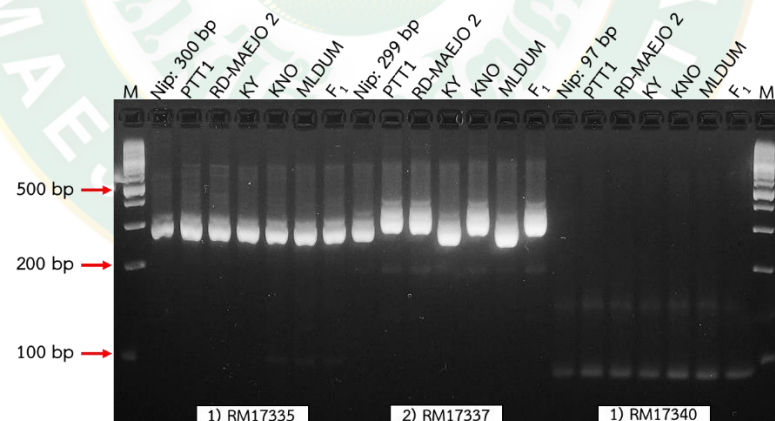
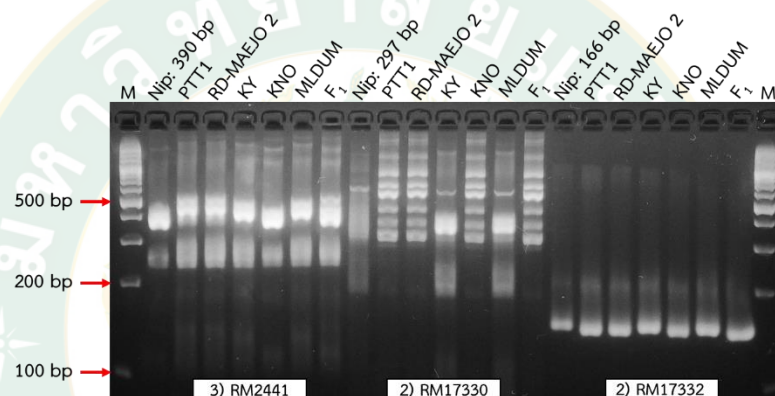
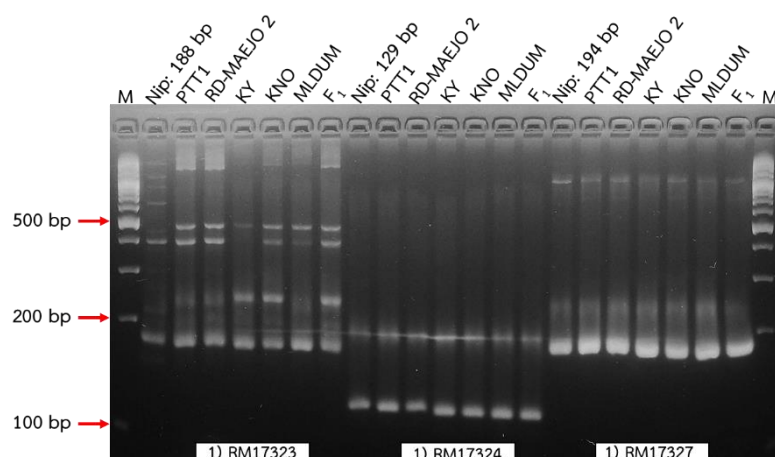
การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* จำนวน 22 เครื่องหมาย จากตาราง Supplementary table 18 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น พันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ Nipponbare, กข-แม่โจ้ 2, พันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ กำแพง, พันธุ์ให้ก้าน้อย, มะลิดำ และ F_1 พบว่าสามารถจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

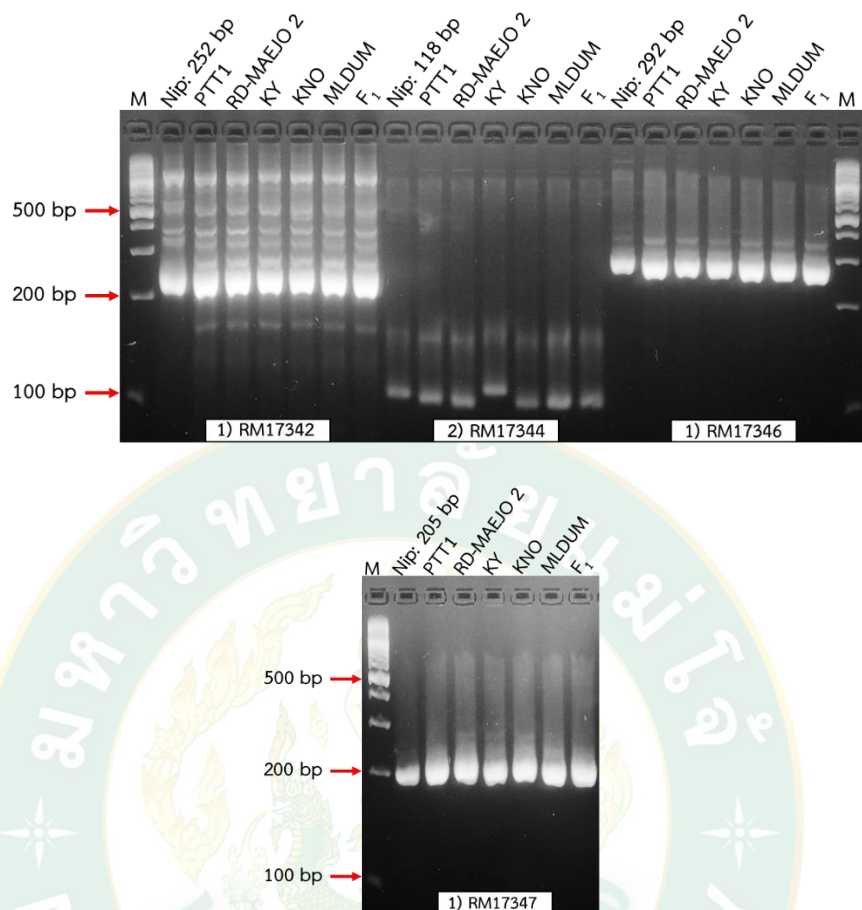
แบบที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (monomorphic bands) ในข้าวทุกพันธุ์ จำนวน 12 เครื่องหมาย คือ RM17261, RM17312, RM17313, RM3092, RM17323, RM17324, RM17327, RM17335, RM17340, RM17342, RM17346 และ RM17347

แบบที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic bands) ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้ จำนวน 5 เครื่องหมาย คือ RM17315, RM17330, RM17332, RM17337 และ RM17344

แบบที่ 3 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic bands) ระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย และตรวจสอบ F_1 ได้ จำนวน 5 เครื่องหมาย คือ RM17314, RM17322, RM17317, RM17321 และ RM2441 โดยพบขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และ กข-แม่โจ้ 2 มีขนาดเท่ากัน แต่ขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ พันธุ์กำแพง ก้าน้อย และมะลิดำ แตกต่างกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และมีขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ รายละเอียดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันแสดงดังภาพที่ 21 และตารางที่ 5







ภาพที่ 21 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* ทั้งหมด จำนวน 22 เครื่องหมาย คือ RM17261 - RM17347 ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ และตรวจสอบ F₁, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Nip คือ Nipponbare, PTT1 คือ ปทุมธานี 1, RD-MAEJO 2 คือ กข-แม่โจ้ 2, KY คือ กำแพงใหญ่, KNO คือ กำแพงน้อย, MLDUM คือ มะลิดำ

หมายเหตุ

- 1) คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (monomorphic bands)
- 2) คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic bands) ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบลูกผสม F₁ ได้
- 3) คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic bands) ระหว่างข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 กับข้าวพันธุ์ให้กำแพงน้อย และตรวจสอบ F₁ ได้

ตารางที่ 5 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน OsB1&B2

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ	ขนาดแถบดีเอ็นเอ ของ Nip (Sup. table 18) (คู่เบส)	ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวในงานวิจัยนี้ (คู่เบส)									รูปแบบแถบดีเอ็นเอ		พันธุ์ข้าวคำที่ให้ แถบดีเอ็นเอต่าง จากข้าวขาว	การจำแนก F ₁
			เชื้อหุ้มเมล็ดสีขาว			เชื้อหุ้มเมล็ดสีดำ			ลูกผสม (PTT1 x KNO)						
			Nip (ชุดควบคุม)	PTT1	RD- MAEJO 2	KY	KNO	MLDUM							
1	RM17261	173	173	< 173 ¹	< 173 ¹	< 173 ¹	< 173 ¹	< 173 ¹	< 173 ¹	✓	-	-	-		
2	RM17312	152	152	152 ¹	152 ¹	152 ¹	152 ¹	152 ¹	152 ¹	✓	-	-	-		
3	RM17313	188	188	188 ¹	188 ¹	188 ¹	188 ¹	188 ¹	188 ¹	✓	-	-	-		
4	RM17314	149	149	149 ¹	149 ¹	149 ¹	< 149 ²	< 149 ²	> 149 ³	-	✓	KY, KNO, MLDUM	✓		
5	RM17315	193	193	< 193 ¹	< 193 ¹	< 193 ¹	< 193 ¹	< 193 ¹	193 ²	-	✓	MLDUM	-		
6	RM17317	157	157	> 157 ¹	> 157 ¹	> 157 ¹	157 ²	157 ²	157 ²	-	✓	KY, KNO, MLDUM	✓		
7	RM3092	315	< 315	< 315 ¹	< 315 ¹	< 315 ¹	< 315 ¹	< 315 ¹	< 315 ¹	✓	-	-	-		
8	RM17321	228	228	> 228 ¹	> 228 ¹	> 228 ¹	228 ²	228 ²	228 ²	-	✓	KY, KNO, MLDUM	✓		
9	RM17322	95	95	< 95 ¹	< 95 ¹	< 95 ¹	< 95 ²	< 95 ²	> 95 ³	-	✓	KY, KNO, MLDUM	✓		
10	RM17323	188	188	188 ¹	188 ¹	188 ¹	188 ¹	188 ¹	188 ¹	✓	-	-	-		
11	RM17324	129	129	129 ¹	129 ¹	129 ¹	129 ¹	129 ¹	129 ¹	✓	-	-	-		
12	RM17327	194	194	194 ¹	194 ¹	194 ¹	194 ¹	194 ¹	194 ¹	✓	-	-	-		
13	RM2441	390	390	> 390 ¹	> 390 ¹	> 390 ¹	> 390 ²	390 ³	> 390 ²	-	✓	KY, KNO, MLDUM	✓		
14	RM17330	297	297	297 ¹	297 ¹	297 ¹	> 297 ²	297 ¹	> 297 ²	-	✓	KY, MLDUM	-		
15	RM17332	166	166	> 166 ¹	> 166 ¹	> 166 ¹	166 ²	> 166 ¹	166 ²	-	✓	KY, MLDUM	-		
16	RM17335	300	300	300 ¹	300 ¹	300 ¹	300 ¹	300 ¹	300 ¹	✓	-	-	-		

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ	ขนาดแถบดีเอ็นเอ ของ Nip (Sup. table 18) (คู่เบส)	ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวในงานวิจัยนี้ (คู่เบส)							รูปแบบแถบดีเอ็นเอ		พันธุ์ข้าวดำที่ให้ แถบดีเอ็นเอต่าง จากข้าวขาว	การจำแนก F ₁
			เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว			เยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ			ลูกผสม	mono morphic	poly morphic		
			Nip (ชุดควบคุม)	PTT1	RD- MAEJO 2	KY	KNO	MLDUM					
17	RM17337	299	299	> 299 ¹	> 299 ¹	< 299 ²	> 299 ¹	< 299 ²	> 299 ¹	-	√	KY, MLDUM	-
18	RM17340	97	97	97 ¹	97 ¹	97 ¹	97 ¹	97 ¹	97 ¹	√	-	-	-
19	RM17342	252	252	252 ¹	252 ¹	252 ¹	252 ¹	252 ¹	252 ¹	√	-	-	-
20	RM17344	118	118	< 118 ¹	< 118 ¹	> 118 ²	< 118 ¹	< 118 ¹	< 118 ¹	-	√	KY	-
21	RM17346	292	292	292 ¹	292 ¹	292 ¹	292 ¹	292 ¹	292 ¹	√	-	-	-
22	RM17347	205	205	205 ¹	205 ¹	205 ¹	205 ¹	205 ¹	205 ¹	√	-	-	-

หมายเหตุ เลขยกกำลัง 1, 2 และ 3 คือ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันในแต่ละเครื่องหมายโดยเปรียบเทียบกับขนาดแถบดีเอ็นเอของ Nipponbare (Nip) จากตาราง Supplementary table 18 (Sup. table 18) แบบที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ, √ คือ ได้ - คือ ไม่ได้
 < คือ ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวตัวอย่างน้อยกว่าขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ Nipponbare (Sup. table 18)
 > คือ ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวตัวอย่างมากกว่าขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ Nipponbare (Sup. table 18)

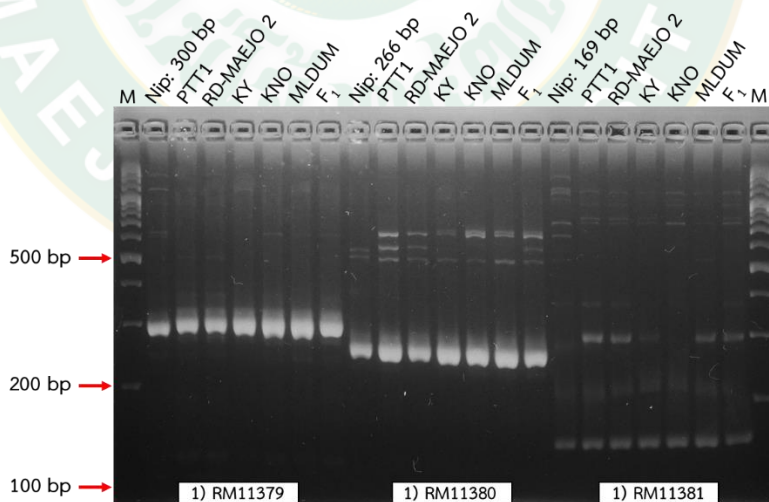
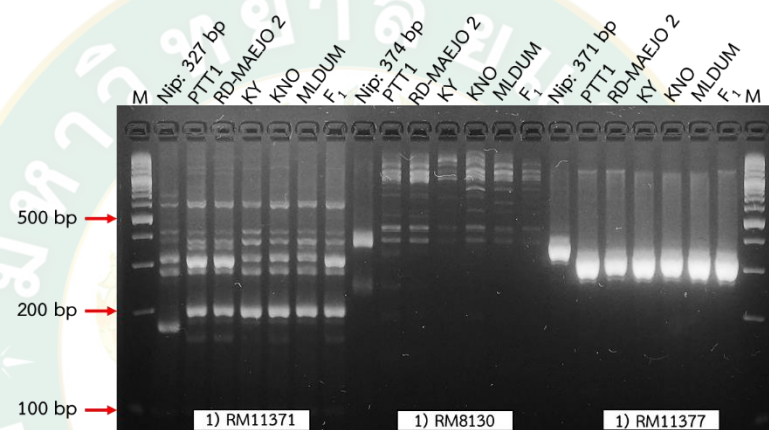
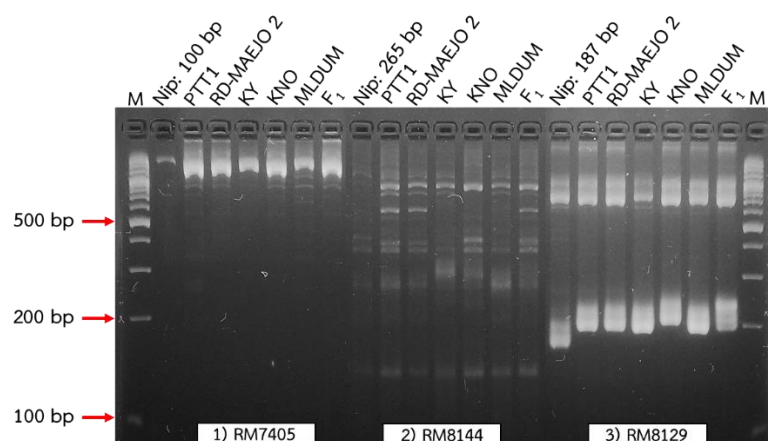
4.1.2 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsDFR*

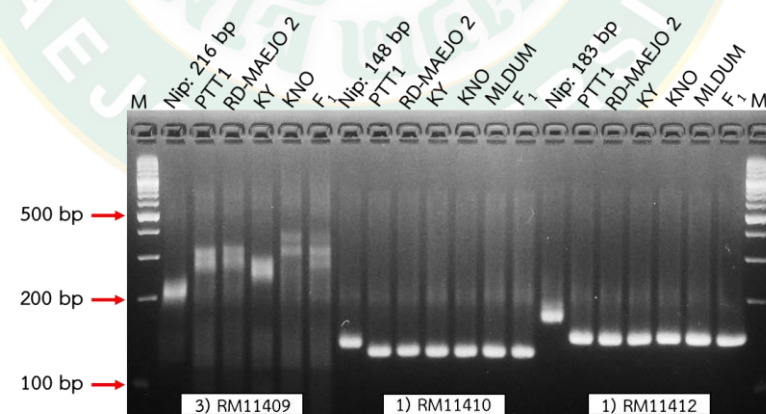
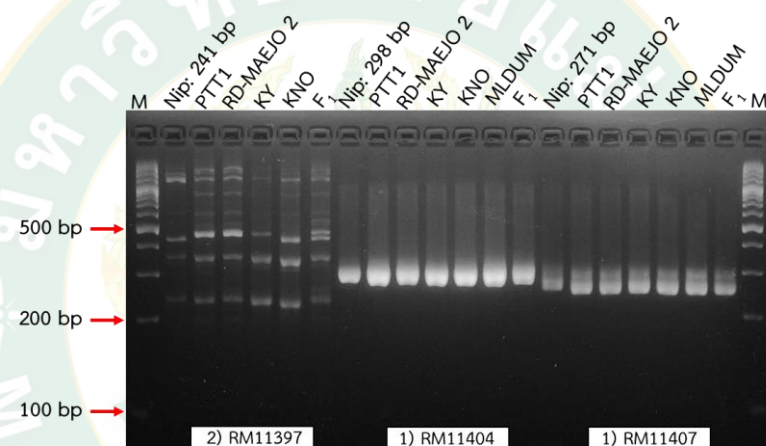
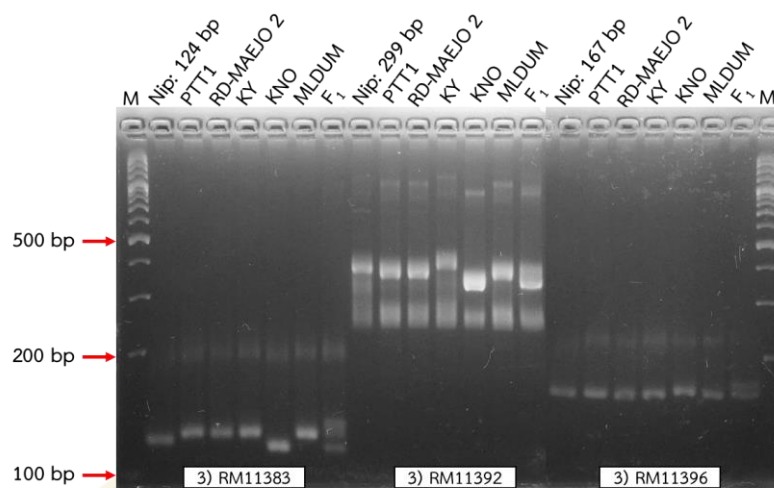
การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* จำนวน 24 เครื่องหมาย จากตาราง Supplementary table 18 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น พันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ Nipponbare, กข-แม่โจ้ 2, พันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ กำแพงใหญ่, พันธุ์ให้ก้าน้อย, มะลิดำ และ F_1 พบว่าสามารถจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

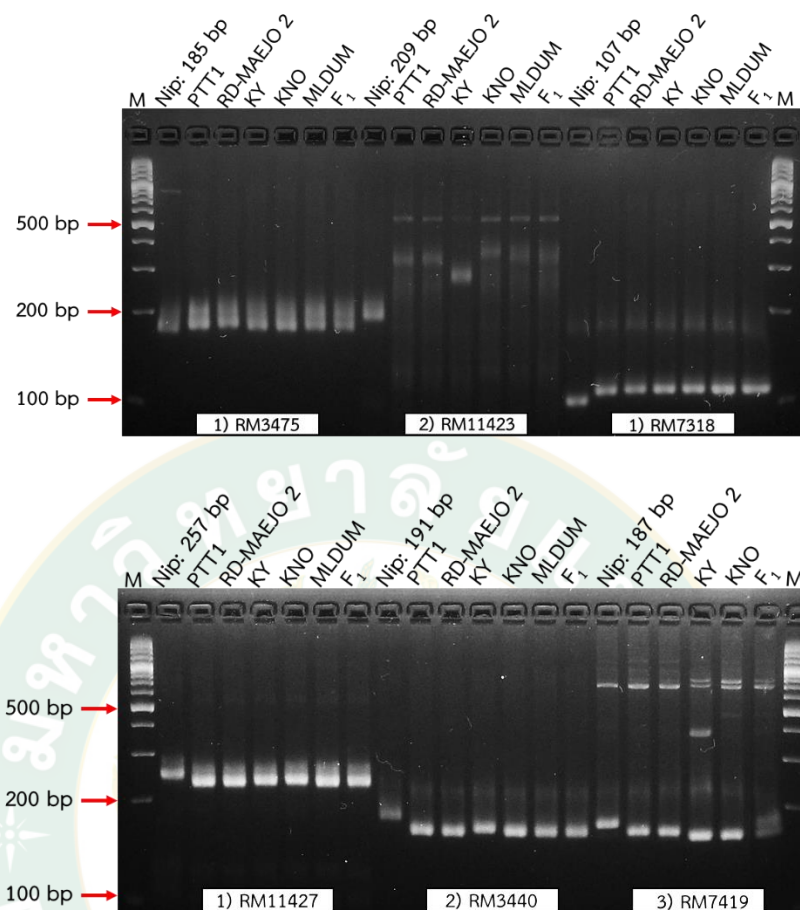
แบบที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (monomorphic bands) ในข้าวทุกพันธุ์ จำนวน 14 เครื่องหมาย คือ RM7405, RM11371, RM8130, RM11377, RM11379, RM11380, RM11381, RM11404, RM11407, RM11410, RM11412, RM3475, RM7318 และ RM11427

แบบที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic bands) ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้ จำนวน 4 เครื่องหมาย คือ RM8144, RM11397, RM11423 และ RM3440

แบบที่ 3 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย และตรวจสอบ F_1 ได้ จำนวน 6 เครื่องหมาย คือ RM8129, RM11396, RM11383, RM11392, RM7419 และ RM11409 โดยพบขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และ กข-แม่โจ้ 2 มีขนาดเท่ากัน แต่ขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ พันธุ์กำแพงใหญ่ ก้าน้อย และมะลิดำ แตกต่างกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และมีขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ รายละเอียดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันแสดงดังภาพที่ 22 และตารางที่ 6







ภาพที่ 22 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ทั้งหมด จำนวน 24 เครื่องหมาย คือ RM7405-RM7419 ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ และตรวจสอบ F_1 , M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Nip คือ Nipponbare, PTT1 คือ ปทุมธานี 1, RD-MAEJO 2 คือ กข-แม่โจ้ 2, KY คือ กำแพงใหญ่, KNO คือ กำแพงน้อย, MLDUM คือ มะลิดำ

หมายเหตุ

- 1) คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (monomorphic)
- 2) คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic bands) ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้
- 3) คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic bands) ระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับข้าวพันธุ์ให้กำแพงน้อย และตรวจสอบ F_1 ได้

ตารางที่ 6 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR*

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ	ขนาดแถบดีเอ็นเอของ Nip (Sup. table 18) (คู่เบส)	ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวในงานวิจัยนี้ (คู่เบส)							รูปแบบแถบดีเอ็นเอ		พันธุ์ข้าวดำที่ให้ แถบดีเอ็นเอต่าง จากข้าวขาว	การจำแนก F ₁
			เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว			เยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ			ลูกผสม F ₁	mono morphic	poly morphic		
			Nip (ชุดควบคุม)	PTT1	RD- MAEJO 2	KY	KNO	MLDUM					
1	RM7405	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	RM8144	265	265	265 ¹	265 ¹	> 265 ²	> 265 ²	265 ¹	265 ¹	-	√	KY, KNO	-
3	RM8129	187	187	> 187 ¹	> 187 ¹	> 187 ²	> 187 ³	> 187 ²	> 187 ¹ , > 187 ³	-	√	KY, KNO, MLDUM	√
4	RM11371	327	327	327 ¹	327 ¹	327 ¹	327 ¹	327 ¹	327 ¹	√	-	-	-
5	RM8130	374	374	374 ¹	374 ¹	374 ¹	374 ¹	374 ¹	374 ¹	√	-	-	-
6	RM11377	371	371	< 371 ¹	< 371 ¹	< 371 ¹	< 371 ¹	< 371 ¹	< 371 ¹	√	-	-	-
7	RM11379	300	300	300 ¹	300 ¹	300 ¹	300 ¹	300 ¹	300 ¹	√	-	-	-
8	RM11380	266	266	266 ¹	266 ¹	266 ¹	266 ¹	266 ¹	266 ¹	√	-	-	-
9	RM11381	169	169	169 ¹	169 ¹	169 ¹	169 ¹	169 ¹	169 ¹	√	-	-	-
10	RM11383	124	124	> 124 ¹	> 124 ¹	> 124 ¹	< 124 ²	> 124 ¹	> 124 ¹ , < 124 ²	-	√	KNO	√
11	RM11392	299	299	< 299 ¹	< 299 ¹	> 299 ²	< 299 ³	< 299 ¹	< 299 ¹ , < 299 ³	-	√	KY, KNO	√
12	RM11396	167	167	167 ¹	167 ¹	167 ¹	> 167 ²	167 ¹	167 ¹ , > 167 ²	-	√	KNO	√
13	RM11397	241	241	241 ¹	241 ¹	< 241 ²	< 241 ³	-	241 ¹	-	√	KY, KNO	-
14	RM11404	298	298	< 298 ¹	< 298 ¹	< 298 ¹	< 298 ¹	< 298 ¹	< 298 ¹	√	-	-	-
15	RM11407	271	271	< 271 ¹	< 271 ¹	< 271 ¹	< 271 ¹	< 271 ¹	< 271 ¹	√	-	-	-
16	RM11409	216	216	> 216 ¹	> 216 ¹	> 216 ²	> 216 ³	-	> 216 ¹ , > 216 ³	-	√	KY, KNO	√

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ	ขนาดแถบดีเอ็นเอ ของ Nip (Sup. table 18) (คู่เบส)	ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวในงานวิจัยนี้ (คู่เบส)							รูปแบบแถบดีเอ็นเอ		พันธุ์ข้าวดำที่ให้ แถบดีเอ็นเอต่าง จากข้าวขาว	การจำแนก F ₁
			เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว			เยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ			ลูกผสม	mono morphic	poly morphic		
			Nip (ชุดควบคุม)	PTT1	RD- MAEJO 2	KY	KNO	MLDUM					
17	RM11410	148	148	< 148 ¹	< 148 ¹	< 148 ¹	< 148 ¹	< 148 ¹	< 148 ¹	√	-	-	-
18	RM11412	183	183	< 183 ¹	< 183 ¹	< 183 ¹	< 183 ¹	< 183 ¹	< 183 ¹	√	-	-	-
19	RM3475	185	185	> 185 ¹	> 185 ¹	> 185 ¹	> 185 ¹	> 185 ¹	> 185 ¹	√	-	-	-
20	RM11423	209	209	> 209 ¹	> 209 ¹	> 209 ²	> 209 ³	> 209 ¹	> 209 ¹	-	√	KY, KNO	-
21	RM7318	107	107	> 107 ¹	> 107 ¹	> 107 ¹	> 107 ¹	> 107 ¹	> 107 ¹	√	-	-	-
22	RM11427	257	257	< 257 ¹	< 257 ¹	< 257 ¹	< 257 ¹	< 257 ¹	< 257 ¹	√	-	-	-
23	RM3440	191	191	< 191 ¹	< 191 ¹	< 191 ²	< 191 ¹	< 191 ¹	< 191 ¹	-	√	KY	-
24	RM7419	187	187	< 187 ¹	< 187 ¹	< 187 ²	< 187 ²	-	< 187 ¹ , < 187 ²	-	√	KY, KNO	√

หมายเหตุ เลขยกกำลัง 1, 2 และ 3 คือ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันในแต่ละเครื่องหมายโดยเปรียบเทียบกับขนาดแถบดีเอ็นเอของ Nipponbare (Nip) จากตาราง

Supplementary table 18 (Sup. table 18) แบบที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ, √ คือ ได้ - คือ ไม่ได้

< คือ ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวตัวอย่างน้อยกว่าขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ Nipponbare (Sup. table 18)

> คือ ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวตัวอย่างมากกว่าขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ Nipponbare (Sup. table 18)

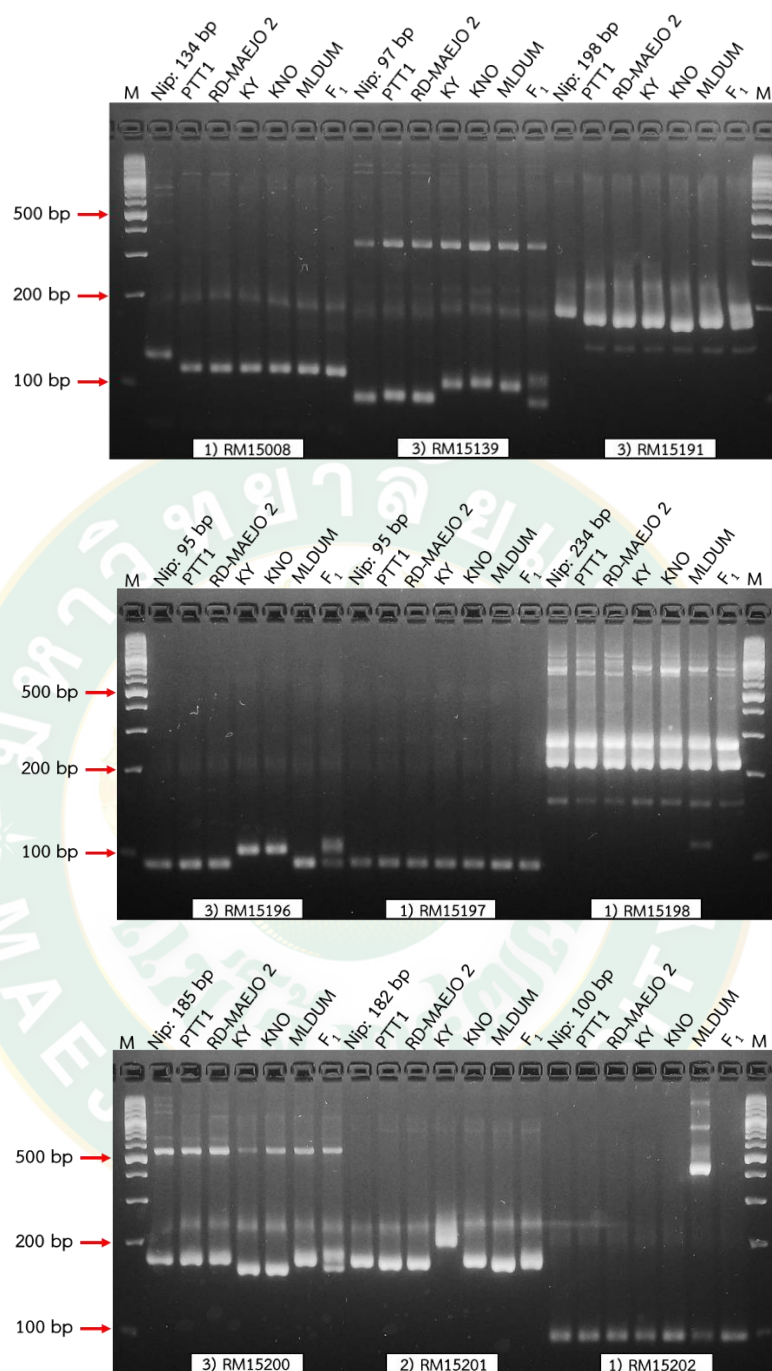
4.1.3 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3*

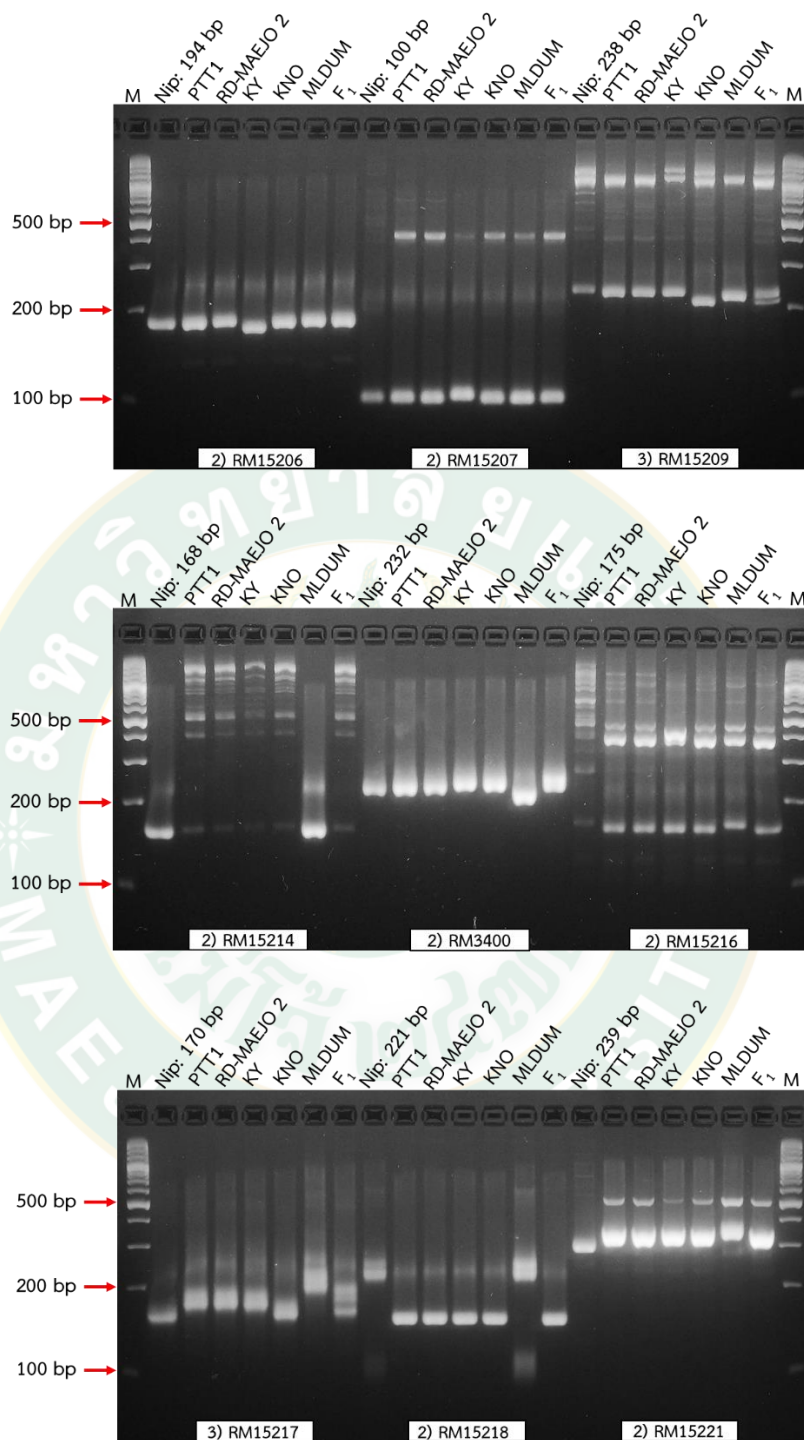
การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3* จำนวน 22 เครื่องหมาย จากตาราง Supplementary table 18 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น พันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ Nipponbare, กข-แม่โจ้ 2, พันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ กำแพงใหญ่, พันธุ์ให้ก้าน้อย, มะลิดำ และ F_1 พบว่าสามารถจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

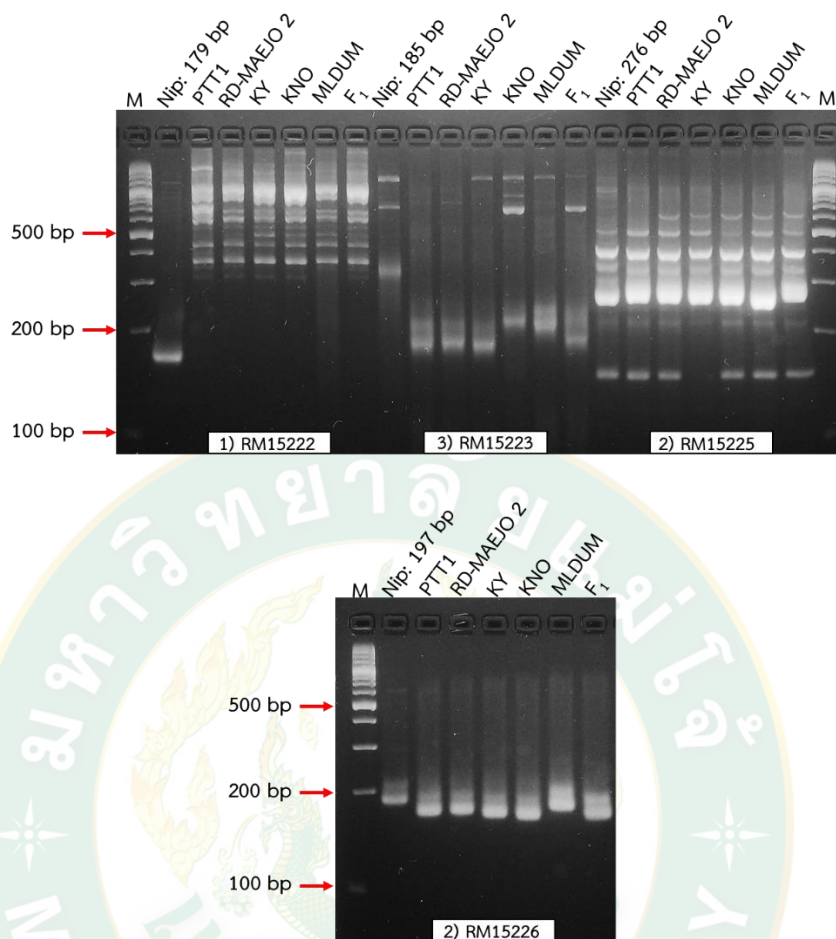
แบบที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (monomorphic bands) ในข้าวทุกพันธุ์ จำนวน 5 เครื่องหมาย คือ RM15008, RM15197, RM15198, RM15202 และ RM15222

แบบที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic bands) ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้ จำนวน 10 เครื่องหมาย คือ RM15201, RM15206, RM15207, RM15214, RM3400, RM15216, RM15218, RM15221 RM15225 และ RM15226

แบบที่ 3 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย และตรวจสอบ F_1 ได้ จำนวน 7 เครื่องหมาย คือ RM15139, RM15191, RM15196, RM15200, RM15209, RM15217 และ RM15223 โดยพบขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และ กข-แม่โจ้ 2 มีขนาดเท่ากัน แต่ขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์กำแพงใหญ่ ก้าน้อย และมะลิดำ แตกต่างกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และมีขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำดังภาพที่ 23 และตารางที่ 7







ภาพที่ 23 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* ทั้งหมดจำนวน 22 เครื่องหมาย คือ RM15008-RM15226 ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ และตรวจสอบ F_1 , M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Nip คือ Nipponbare, PTT1 คือ ปทุมธานี 1, RD-MAEJO 2 คือ กข-แม่โจ้ 2, KY คือ กำแพงใหญ่, KNO คือ กำแพงน้อย, MLDUM คือ มะลิดำ

หมายเหตุ

- 1) คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (monomorphic)
- 2) คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic bands) ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้
- 3) คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic bands) ระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับข้าวพันธุ์ให้กำแพงน้อย และตรวจสอบ F_1 ได้

ตารางที่ 7 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3*

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ	ขนาดแถบดีเอ็นเอ ของ Nip (Sup. table 18) (คู่เบส)	ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวในงานวิจัยนี้ (คู่เบส)							รูปแบบแถบดีเอ็นเอ		พันธุ์ข้าวคำที่ให้ แถบดีเอ็นเอต่าง จากข้าวขาว	การจำแนก F ₁
			เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว			เยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ			ลูกผสม	mono morphic	poly morphic		
			Nip (ชุดควบคุม)	PTT1	RD- MAEJO 2	KY	KNO	MLDUM	F ₁				
1	RM15008	134	134	< 134 ¹	< 134 ¹	< 134 ¹	< 134 ¹	< 134 ¹	< 134 ¹	√	-	-	-
2	RM15139	97	97	97 ¹	97 ¹	> 97 ²	> 97 ²	> 97 ²	97 ¹ , > 97 ²	-	√	KY, KNO, MLDUM	√
3	RM15191	198	198	< 198 ¹	< 198 ¹	< 198 ¹	< 198 ²	< 198 ¹	< 198 ¹ , < 198 ²	-	√	KNO	√
4	RM15196	95	95	95 ¹	95 ¹	> 95 ²	> 95 ²	95 ¹	95 ¹ , > 95 ²	-	√	KY, KNO	√
5	RM15197	95	95	95 ¹	95 ¹	95 ¹	95 ¹	95 ¹	95 ¹	√	-	-	-
6	RM15198	234	234	234 ¹	234 ¹	234 ¹	234 ¹	234 ¹	234 ¹	√	-	-	-
7	RM15200	185	185	185 ¹	185 ¹	< 185 ²	< 185 ²	185 ¹	185 ¹ , < 185 ²	-	√	KY, KNO	√
8	RM15201	182	182	< 182 ¹	< 182 ¹	> 182 ²	< 182 ¹	< 182 ³	< 182 ¹	-	√	KY, MLDUM	-
9	RM15202	100	100	100 ¹	100 ¹	100 ¹	100 ¹	100 ¹	100 ¹	√	-	-	-
10	RM15206	194	194	194 ¹	194 ¹	< 194 ²	194 ¹	194 ¹	194 ¹	-	√	KY	-
11	RM15207	100	100	100 ¹	100 ¹	> 100 ²	100 ¹	100 ¹	100 ¹	-	√	KY	-
12	RM15209	238	238	238 ¹	238 ¹	238 ¹	< 238 ²	238 ¹	238 ¹ , < 238 ²	-	√	KNO	√
13	RM15214	168	168	168 ¹	168 ¹	168 ¹	168 ¹	< 168 ²	168 ¹	-	√	MLDUM	-
14	RM3400	232	232	232 ¹	232 ¹	> 232 ²	> 232 ²	< 232 ³	> 232 ²	-	√	KY, KNO, MLDUM	-
15	RM15216	175	175	< 175 ¹	< 175 ¹	< 175 ¹	< 175 ¹	175 ²	< 175 ¹	-	√	MLDUM	-
16	RM15217	170	170	> 170 ¹	> 170 ¹	> 170 ¹	170 ²	> 170 ³	> 170 ¹ , 170 ²	-	√	KNO, MLDUM	√

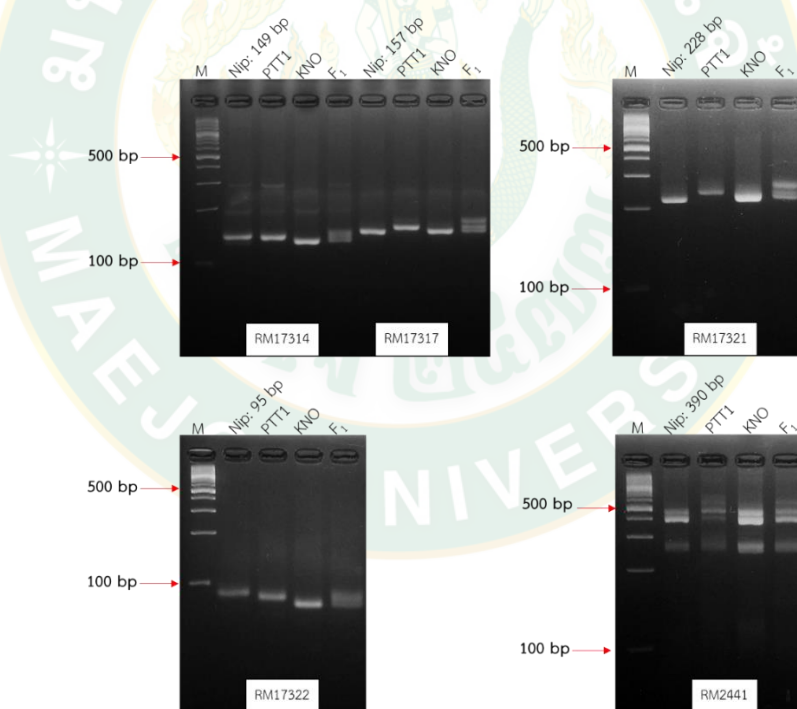
ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ	ขนาดแถบดีเอ็นเอ ของ Nip (Sup. table 18) (คู่เบส)	ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวในงานวิจัยนี้ (คู่เบส)							รูปแบบแถบดีเอ็นเอ		พันธุ์ข้าวดำที่ให้ แถบดีเอ็นเอต่าง จากข้าวขาว	การจำแนก F ₁
			เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว			เยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ			ลูกผสม	mono morphic	poly morphic		
			Nip (ชุดควบคุม)	PTT1	RD- MAEJO 2	KY	KNO	MLDUM					
17	RM15218	221	221	< 221 ¹	< 221 ¹	< 221 ¹	< 221 ¹	221 ²	< 221 ¹	-	√	MLDUM	-
18	RM15221	239	239	> 239 ¹	> 239 ¹	> 239 ¹	> 239 ¹	> 239 ²	> 239 ¹	-	√	MLDUM	-
19	RM15222	179	179	> 179 ¹	> 179 ¹	> 179 ¹	> 179 ¹	> 179 ¹	> 179 ¹	√	-	-	-
20	RM15223	185	> 185	185 ¹	185 ¹	185 ¹	> 185 ²	> 185 ³	185 ¹ , >185 ²	-	√	KNO, MLDUM	√
21	RM15225	276	276	276 ¹	276 ¹	276 ¹	276 ¹	< 276 ²	276 ¹	-	√	MLDUM	-
22	RM15226	197	197	< 197 ¹	< 197 ¹	< 197 ²	< 197 ²	< 197 ³	< 197 ¹	-	√	KY, KNO, MLDUM	-

หมายเหตุ เลขยกกำลัง 1, 2 และ 3 คือ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันในแต่ละเครื่องหมายโดยเปรียบเทียบกับขนาดแถบดีเอ็นเอของ Nipponbare (Nip) จากตาราง Supplementary table 18 (Sup. table 18) แบบที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ, √ คือ ได้ - คือ ไม่ได้
 < คือ ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวตัวอย่างน้อยกว่าขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ Nipponbare (Sup. table 18)
 > คือ ขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวตัวอย่างมากกว่าขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ Nipponbare (Sup. table 18)

4.2 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ

4.2.1 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*

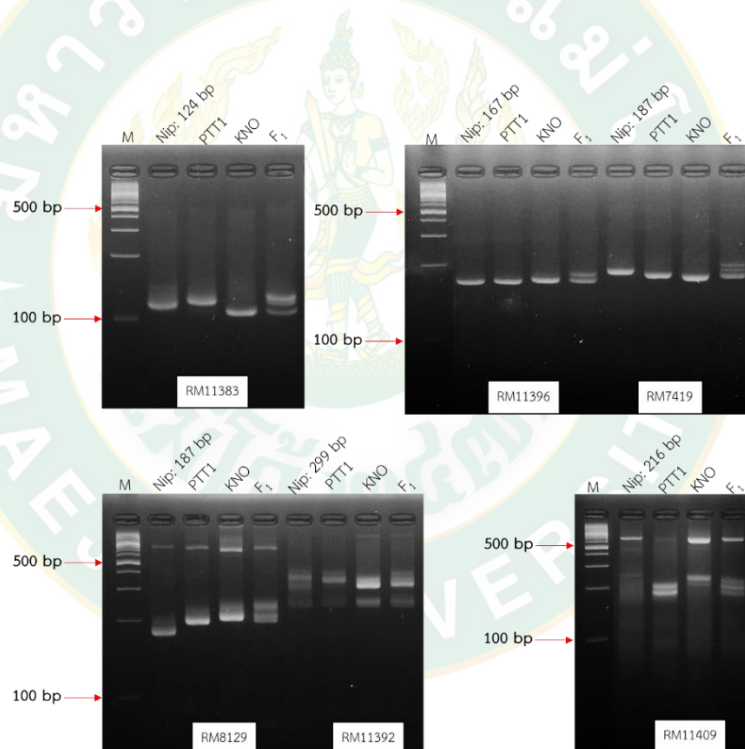
การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* จากเครื่องหมายทั้งหมด จำนวน 22 เครื่องหมาย พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 5 เครื่องหมาย ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับพุ่มธานี 1 กับข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย และตรวจสอบลูกผสม F_1 ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมือนพันธุ์แม่ 1 แถบ และพันธุ์พ่อ 1 แถบ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17314, RM17317, RM17321, RM17322 และ RM2441 จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ (single band) ที่จำเพาะกับพันธุ์รับพุ่มธานี 1 และพันธุ์ให้ก้าน้อย โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ และลูกผสม F_1 ได้ชัดเจนที่สุด และตำแหน่งของเครื่องหมายมีระยะห่างใกล้เคียงตำแหน่งยีน คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และนำไปตรวจสอบประชากร F_2 ในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* จำนวน 5 เครื่องหมาย ที่สามารถแยกข้าวพันธุ์รับพุ่มธานี 1 (PTT1) กับพันธุ์ให้ก้าน้อย (KNO) และตรวจสอบ F_1 ได้
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Nip คือ Nipponbare

4.2.2 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอยัดติดกับยีน *OsDFR*

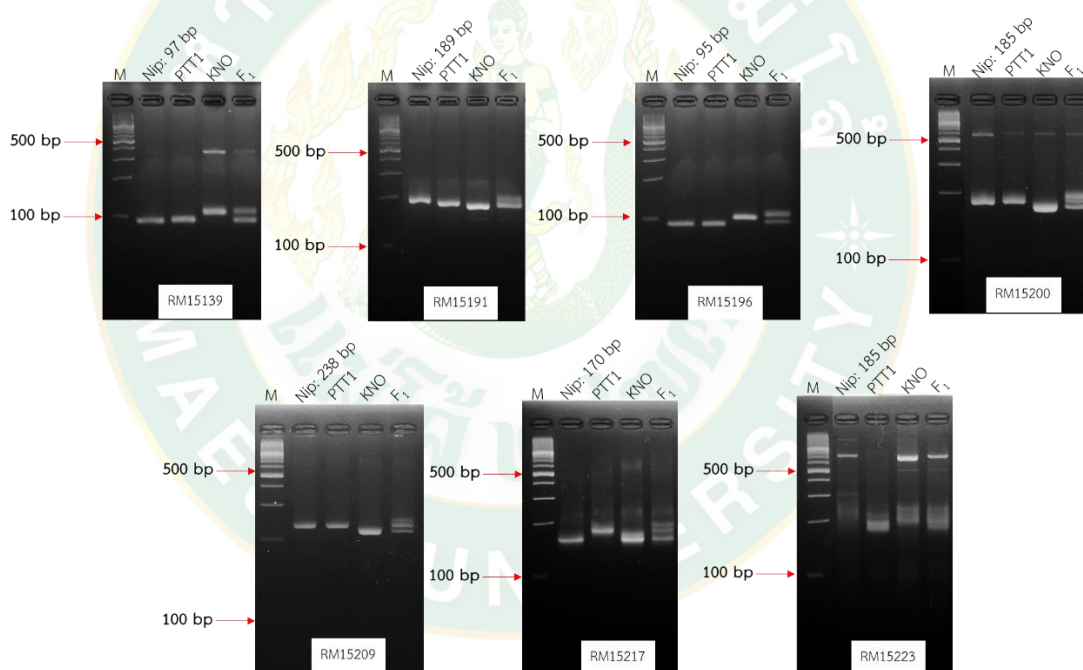
การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* จากเครื่องหมายทั้งหมด จำนวน 24 เครื่องหมาย พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 6 เครื่องหมาย ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย และตรวจสอบลูกผสม F_1 ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมือนพันธุ์แม่ 1 แถบ และพันธุ์พ่อ 1 แถบ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11396, RM11392, RM11383, RM7419, RM8129 และ RM11409 จากนั้น คัดเลือกเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ (single band) ที่จำเพาะกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 และพันธุ์ให้ก้าน้อย โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ และลูกผสม F_1 ได้ชัดเจนที่สุด และตำแหน่งของเครื่องหมายมีระยะห่างไกลยีน คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอเครื่องหมาย RM11383 และนำไปตรวจสอบประชากร F_2 ในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* จำนวน 6 เครื่องหมาย ที่สามารถแยกข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 (PTT1) กับพันธุ์ให้ก้าน้อย (KNO) และตรวจสอบ F_1 ได้
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Nip คือ Nipponbare

4.2.3 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3*

การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3* จากเครื่องหมายทั้งหมด จำนวน 22 เครื่องหมาย พบว่ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 7 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย และตรวจสอบลูกผสม F_1 ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมือนพันธุ์แม่ 1 แถบ และพันธุ์พ่อ 1 แถบ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15139, RM15191, RM15196, RM15200, RM15209, RM15217 และ RM15223 จากนั้น คัดเลือกเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ (single band) ที่จำเพาะกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 และพันธุ์ให้ก้าน้อย โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่ และพันธุ์พ่อ และลูกผสม F_1 ได้ชัดเจนที่สุด และตำแหน่งของเครื่องหมายมีระยะห่างไกลยีนที่สุด คือ เครื่องหมาย RM15209 และนำไปตรวจสอบประชากร F_2 ในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 26)

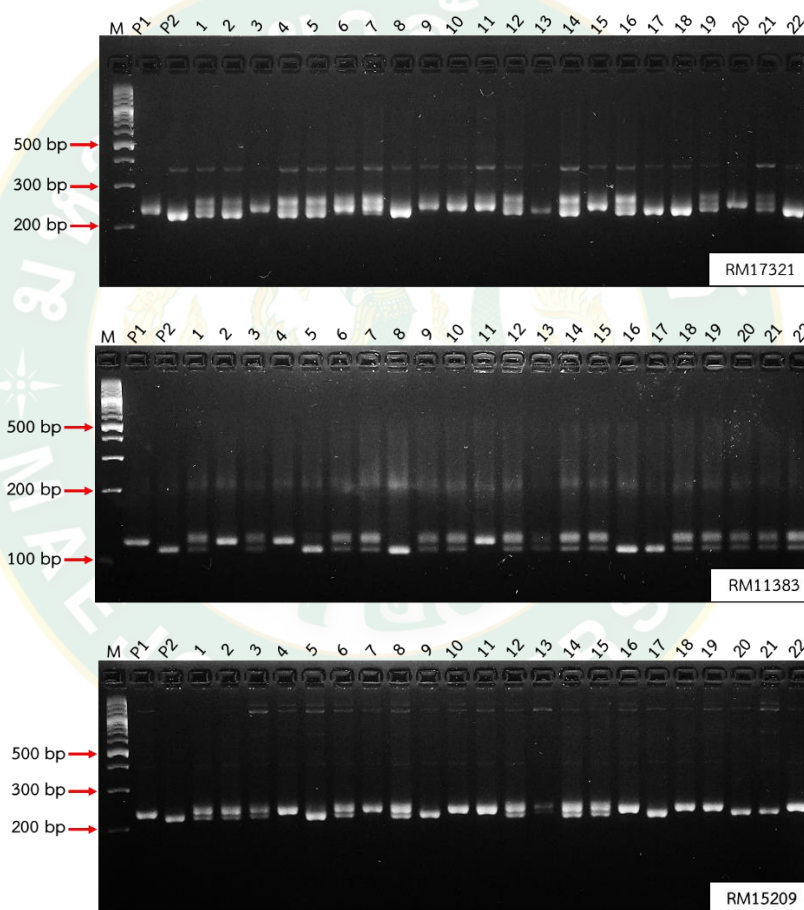


ภาพที่ 26 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3* จำนวน 7 เครื่องหมาย ที่สามารถแยกข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 (PTT1) กับพันธุ์ให้ก้าน้อย (KNO) และตรวจสอบ F_1 ได้

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Nip คือ Nipponbare

4.3 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร F₂ บางส่วน

การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร F₂ พบว่า ตัวอย่างที่ 1-22 สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจสอบได้ชัดเจน โดยพบแถบดีเอ็นเอ 3 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอที่เท่ากับข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 จำนวน 1 แถบ แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอที่เท่ากับข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย จำนวน 1 แถบ และแบบที่ 3 พบแถบดีเอ็นเอที่เท่ากับพันธุ์รับและพันธุ์ให้ อย่างละ 1 แถบ (ภาพที่ 27) จึงใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ในการตรวจสอบประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 27 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร F₂ ต้นที่ 1-22, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

5. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร F_2

5.1 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

5.1.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*

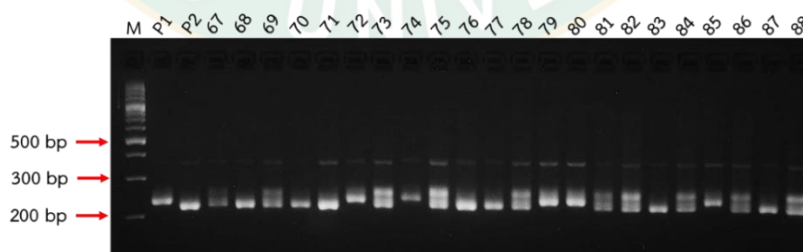
จากผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* ในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบว่า สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ได้ โดยพบจีโนไทป์ 3 แบบ ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอ ดังนี้

แบบที่ 1 KK พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์ให้ก้าน้อย มีขนาดน้อยกว่า 228 คู่เบส

แบบที่ 2 PP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับปทุมธานี มีขนาดประมาณ 228 คู่เบส

แบบที่ 3 KP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์ปทุมธานี 1 (P) และพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) อย่างละ 1 แถบ มีขนาดประมาณ 228 และน้อยกว่า 228 คู่เบส ตามลำดับ

ในประชากร F_2 พบจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM17321 แบบ KK จำนวน 73 ต้น แบบ PP จำนวน 70 ต้น และแบบ KP จำนวน 157 ต้น (ภาพที่ 28) อย่างไรก็ตาม พบว่า มีต้น F_2 จำนวน 18 ต้น คือ ต้นที่ 2, 70, 87, 98, 132, 159, 164, 165, 182, 190, 193, 207, 224, 244, 247, 261, 279 และ 284 ที่ไม่สามารถจำแนกจีโนไทป์ได้ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอไม่คมชัด ทำให้ยากต่อการจำแนกจีโนไทป์ ระหว่าง homozygous หรือ heterozygous จึงได้ทำการตรวจสอบซ้ำ



ภาพที่ 28 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*

บางส่วน จากประชากร F_2 ตัวเลข 67-88 คือ ต้นที่ 67-88, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1,

P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

5.1.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR*

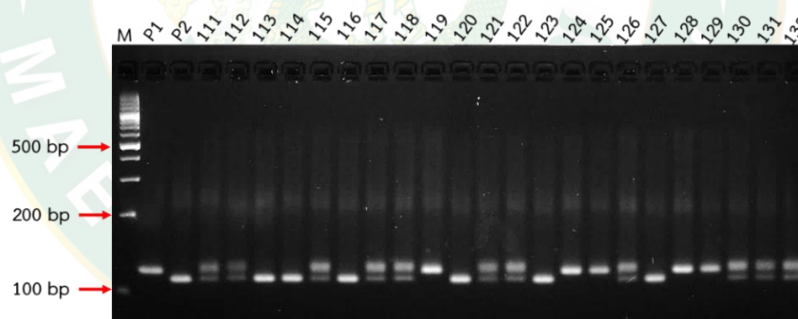
จากผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบว่า สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ได้ โดยพบจีโนไทป์ 3 แบบ ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอ ดังนี้

แบบที่ 1 KK พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์ให้ก้าน้อย มีขนาดน้อยกว่า 124 คู่เบส

แบบที่ 2 PP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 มีขนาดประมาณ 124 คู่เบส

แบบที่ 3 KP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 (P) จำนวน 1 แถบ และพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) จำนวน 1 แถบ มีขนาดประมาณ 124 และ น้อยกว่า 124 คู่เบส ตามลำดับ

ในประชากร F_2 พบจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM11383 แบบ KK จำนวน 76 ต้น แบบ PP จำนวน 66 ต้น และแบบ KP จำนวน 158 ต้น (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* บางส่วน จากประชากร F_2 ตัวเลข 111-132 คือ ต้นที่ 111-132, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

5.1.3 เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3*

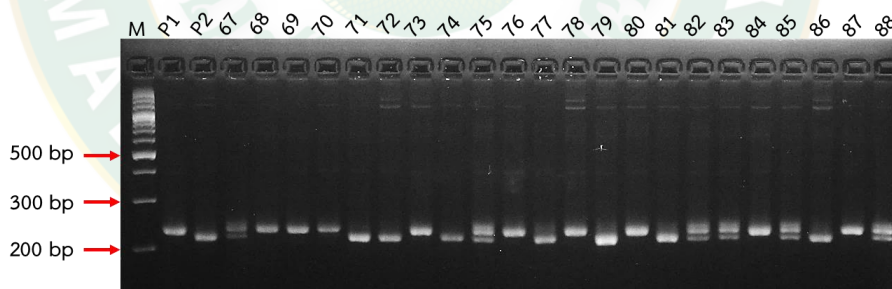
จากผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* ในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบว่า สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ได้ โดยพบจีโนไทป์ 3 แบบ ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอ ดังนี้

แบบที่ 1 KK พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์ให้ก้าน้อย มีขนาดน้อยกว่า 238 คู่เบส

แบบที่ 2 PP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 มีขนาดประมาณ 238 คู่เบส

แบบที่ 3 KP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 (P) จำนวน 1 แถบ และพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) จำนวน 1 แถบ มีขนาดประมาณ 238 และน้อยกว่า 238 คู่เบส ตามลำดับ

ในประชากร F_2 พบจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM15209 แบบ KK จำนวน 66 ต้น แบบ PP จำนวน 82 ต้น และแบบ KP จำนวน 152 ต้น (ภาพที่ 30) อย่างไรก็ตามไม่พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 ต้น คือ ต้นที่ 119 และ 120 จึงได้ทำการตรวจสอบซ้ำ



ภาพที่ 30 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* บางส่วน จากประชากร F_2 ตัวเลข 67-88 คือ ต้นที่ 67-88, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

5.2 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายชนิด SSR

การศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ RM17321, RM11383 และ RM15209 ตามลำดับ ในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น โดยนำข้อมูลจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมาย จากข้อ 5.1 มาทดสอบไคสแควร์ มีสมมติฐาน คือ อัตราส่วนของจีโนไทป์ แบบ KK: KP: PP เท่ากับ 1: 2: 1 ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล

จากการทดสอบไคสแควร์ในประชากร F_2 พบว่า การคำนวณค่าไคสแควร์ของเครื่องหมาย RM17321, RM11383 และ RM15209 มีค่าเท่ากับ 0.713, 1.520 และ 1.760 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าไคสแควร์ในตารางที่ค่า $df = 2$ ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ 5.991 และค่า p -value มากกว่า 0.05 แสดงว่าการถ่ายทอดของเครื่องหมาย RM17321, RM11383 และ RM15209 เป็นไปตามสมมติฐาน คือ อัตราส่วนจีโนไทป์ในประชากร F_2 เท่ากับ 1KK: 2KP: 1PP ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ในประชากร F_2 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ/ยีน	ข้อมูล	จีโนไทป์ของ เครื่องหมายดีเอ็นเอ			ประชากร ทั้งหมด	χ^2 (1KK: 2KP: 1PP) $df = 2$	p-value
		KK	KP	PP			
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	ค่าสังเกต	73	157	70	300	0.713	0.700
	ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
RM11383/ <i>OsDFR</i>	ค่าสังเกต	76	158	66	300	1.520	0.468
	ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	ค่าสังเกต	66	152	82	300	1.760	0.415
	ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		

หมายเหตุ p -value > 0.05 ยอมรับสมมติฐาน และ p -value < 0.05 ปฏิเสธสมมติฐาน

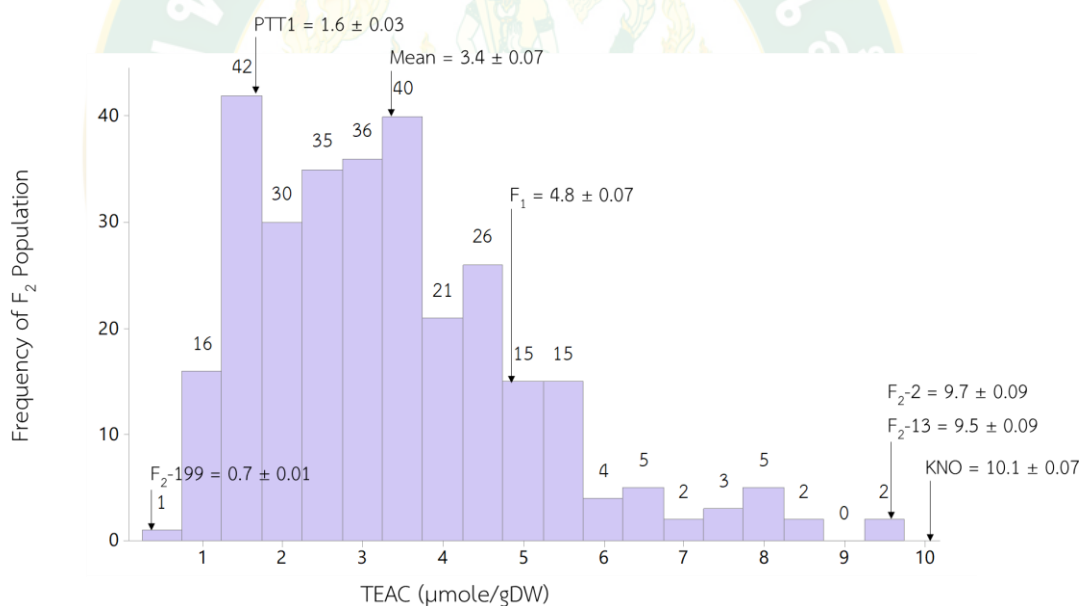
KK คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย,

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) และพันธุ์รับปทุมธานี 1 (P),

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

5.3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในประชากร F₂

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ใช้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร (A_{516}) จากผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เมล็ดแก่ของข้าว คือ พันธุ์รับปฐมธานี 1, พันธุ์ให้ก้าน้อย, และ F₁ พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 1.6, 10.1 และ 4.8 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น พบว่า มีการกระจายของค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 3.4 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ต้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด คือ ต้นที่ 199 มีค่าเท่ากับ 0.7 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ต้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ ต้นที่ 2 มีค่าเท่ากับ 9.7 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง รองลงมา คือ ต้นที่ 13 มีค่าเท่ากับ 9.5 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นที่ 2 และ 13 เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ให้ก้าน้อย พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 ฮิสโทแกรม (Histogram) แสดงการกระจายของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH รายงานผลในรูปของ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) หน่วย คือ ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง (μmole/gDW), PTT1 คือ พันธุ์รับปฐมธานี 1, KNO คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, F₂-199, F₂-2 และ F₂-13 คือ ประชากร F₂ ต้นที่ 199, 2 และ 13 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เมล็ดของประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบว่า ต้นที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 9.7 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง มีจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยืดยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ คือ KP, PP และ KP ส่วนต้นที่ 199 ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่าต่ำที่สุด เท่ากับ 0.7 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง มีจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยืดยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ คือ PP, KK และ KP (ตารางที่ 9) แสดงว่าการมีอัลลีล K ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อยของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยืดยึดติดกับยีน *OsB1&B2* อย่างน้อย 1 อัลลีล อาจจะจำเป็นสำหรับการทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งจะต้องทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวข้อถัดไป ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยืดยึดติดกับยีน *OsDFR* และ *OsMYB3* ไม่สามารถวิเคราะห์จีโนไทป์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในขั้นตอนนี้ เนื่องจากต้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (ต้นที่ 2 และ 13) และต้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ (ต้นที่ 199) มีจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอและค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่สอดคล้องกัน

ตารางที่ 9 จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยืดยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเมล็ดแก่ของพันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)

ข้าว	จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ			ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($\mu\text{mole/gDW}$)
	RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	RM11383/ <i>OsDFR</i>	RM15209/ <i>OsMYB3</i>	
PTT1	PP	PP	PP	1.6
KNO	KK	KK	KK	10.1
F_1	KP	KP	KP	4.8
F_2 -2	KP	PP	KP	9.75
F_2 -13	KK	KP	KP	9.5
F_2 -199	PP	KK	KP	0.68

หมายเหตุ KK คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย, KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) และพันธุ์รับปทุมธานี 1 (P), PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรายงานผลในรูปของ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) หน่วย คือ ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ($\mu\text{mole/gDW}$)

6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ คือ เครื่องหมาย RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น ประกอบด้วย การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ด้วยวิธี ANOVA จากนั้นวิเคราะห์หาระดับและทิศทางความสัมพันธ์ด้วยวิธี Pearson correlation และวิเคราะห์ถดถอยโดยวิธี ถดถอยอย่างง่าย (Simple regression) และ ถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) การวิเคราะห์ข้อมูลกำหนดให้จีโนไทป์ของทุกเครื่องหมายแทนด้วยสัญลักษณ์ KK, KP และ PP โดย K คือ อัลลีลของพันธุ์ก้าน้อย และ P คือ อัลลีลของพันธุ์พุ่มธานี 1

6.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ANOVA

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ANOVA แบ่งออกเป็น 2 การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง ดังนี้

6.1.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ANOVA

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ด้วยวิธี Tukey พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่า ยอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ดังนั้นเครื่องหมาย RM17321 และ RM15209 จึงมีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทางสถิติ ไม่สามารถจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ได้ และไม่มีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2

เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	จีโนไทป์	จำนวนประชากร	ฟีโนไทป์			
		F_2	ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KK	73	4.780	a	1.658	0.000*
	KP	157	3.477	b	1.351	
	PP	70	1.613	c	0.523	
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KK	76	3.444	a	1.626	0.103 ^{ns}
	KP	158	3.482	a	1.816	
	PP	66	2.966	a	1.442	
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KK	66	4.056	a	2.156	0.000*
	KP	152	3.339	b	1.611	
	PP	82	2.835	b	1.196	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, a, b และ c คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

KK คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย

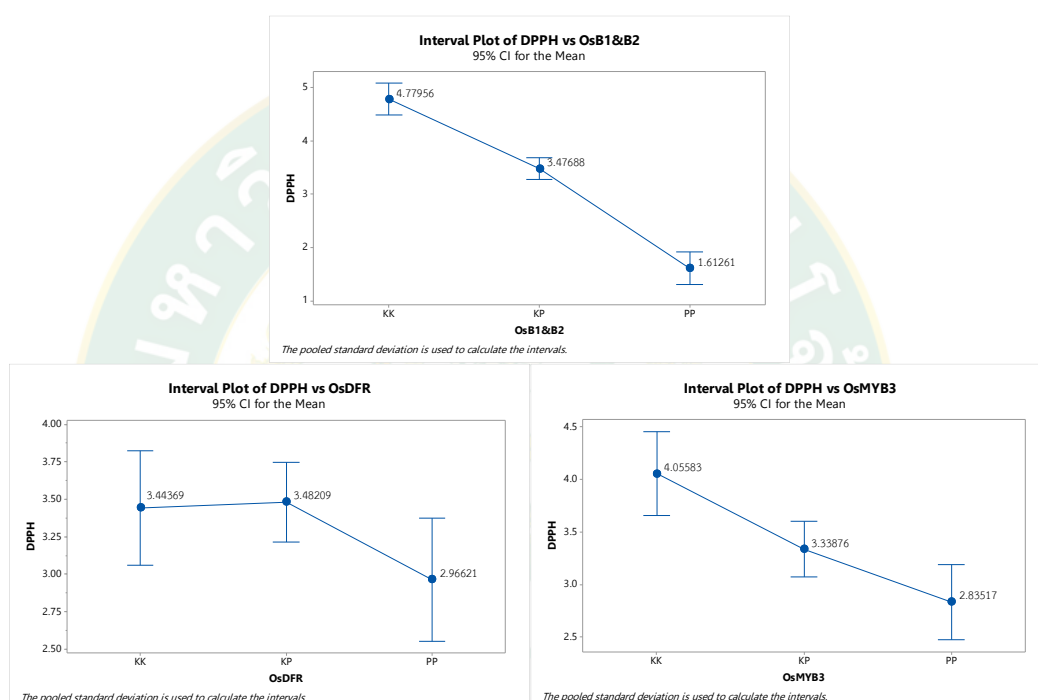
KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ชัดเจน ตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยจีโนไทป์แบบ KK, KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่ม a, b และ c ตามลำดับ ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 32)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้ตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยจีโนไทป์แบบ KK, KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกัน คือ กลุ่ม a ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีอิทธิพลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 32)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งกลุ่มตามสภาพของจีโนไทป์ได้ 2 กลุ่ม ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ โดยจีโนไทป์แบบ KK ถูกจัดอยู่กลุ่ม a ส่วนจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกัน คือ กลุ่ม b ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีอิทธิพลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถใช้ในการคัดเลือกลำต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์แบบ KK, KP และ PP ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับในประชากร F_2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

6.1.2 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนร่วมกัน 2 ตำแหน่ง กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ANOVA

จากการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ ข้อ 6.1.1 พบว่าเครื่องหมาย RM11383 ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น จึงได้ทำการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ 2 เครื่องหมายร่วมกัน คือ RM17321 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น และจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ด้วยวิธี Tukey พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่ายีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* มีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังตารางที่ 11

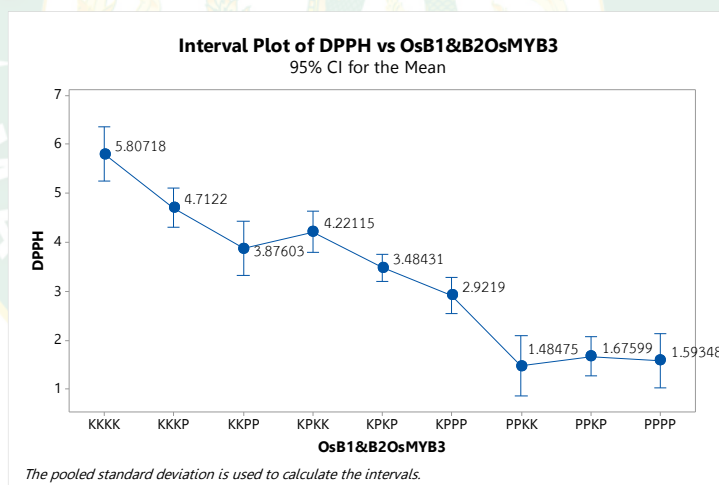
ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2

จีโนไทป์ RM17321 ร่วมกับ RM15209	จำนวน ประชากร F_2	ฟีโนไทป์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ			
		ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
KKKK	19	5.807	a	1.388	0.000*
KKKP	35	4.712	b	1.762	
KKPP	19	3.876	b, c, d	1.107	
KPKK	32	4.221	b, c	1.867	
KPKP	81	3.484	c, d	1.151	
KPPP	44	2.922	d	0.956	
PPKK	15	1.485	e	0.301	
PPKP	36	1.676	e	0.608	
PPPP	19	1.593	e	0.486	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b, c, d และ e คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
KK คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย
KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1
PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งกลุ่มตามสภาพของจีโนไทป์ จำนวน 3 กลุ่ม ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ ได้แก่ กลุ่ม 1 (a) มีจีโนไทป์แบบ KKKK มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด กลุ่ม 2 (b, c, d) มีจีโนไทป์แบบ K__ มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองลงมา และกลุ่ม 3 (e) มีจีโนไทป์แบบ PP__ มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด

ดังนั้น การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM17321 ร่วมกับ RM15209 กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คาดว่ามีอิทธิพลและความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าวที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการไม่มีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 จะทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ และการมีอัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 จะทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น และการมีอัลลีล K จำนวน 2 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ อัลลีล K จำนวน 2 อัลลีล ของเครื่องหมาย RM15209 (KKKK) จะทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์จำนวน 9 แบบ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร F_2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

6.2 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Pearson correlation

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีระดับความสัมพันธ์สูง ค่า r เท่ากับ 0.643 และ p -value เท่ากับ 0.000 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีระดับความสัมพันธ์ต่ำ ค่า r เท่ากับ 0.249 p -value เท่ากับ 0.000 และทุกเครื่องหมายมีทิศทางความสัมพันธ์เชิงบวก ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ค่า r เท่ากับ 0.092 p -value เท่ากับ 0.110 (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	Pearson correlation (r)	p-value
RM17321	<i>OsB1&B2</i>	0.643	0.000*
RM11383	<i>OsDFR</i>	0.092	0.110 ^{ns}
RM15209	<i>OsMYB3</i>	0.249	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

6.3 การวิเคราะห์ถดถอยระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ถดถอยระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ประกอบด้วย การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย (Simple regression) และการวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ดังนี้

6.3.1 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Simple regression

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีถดถอยอย่างง่าย เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 41.30 และ 6.22 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ns) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.86 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของประชากร F_2

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R^2 (เปอร์เซ็นต์)	p-value
RM17321	<i>OsB1&B2</i>	4	41.30	0.000*
RM11383	<i>OsDFR</i>	1	0.86	0.110 ^{ns}
RM15209	<i>OsMYB3</i>	3	6.22	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

6.3.2 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Multiple regression

จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย ข้อ 6.3.1 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 46.64 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R^2 (เปอร์เซ็นต์)	p-value
RM17321 ร่วมกับ RM15209	<i>OsB1&B2</i> <i>OsMYB3</i>	4 3	46.64	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับงานวิจัยของอนงศ์นาฏ และคณะ (2564) รายงานว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ($p > 0.05$) เนื่องจากในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินประกอบด้วยยีนโครงสร้างหลายยีนนอกจากยีน *OsDFR* ดังนั้นอาจจะต้องศึกษายีนโครงสร้างที่สำคัญอื่นในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินร่วมด้วย เช่น *OsLAR*, *OsANS1,2*, *OsUGT*, และ *OsANR* เป็นต้น (Mbanjo et al., 2020; Xia et al., 2021) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

7. การตรวจสอบจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากร BC₁F₁

7.1 การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

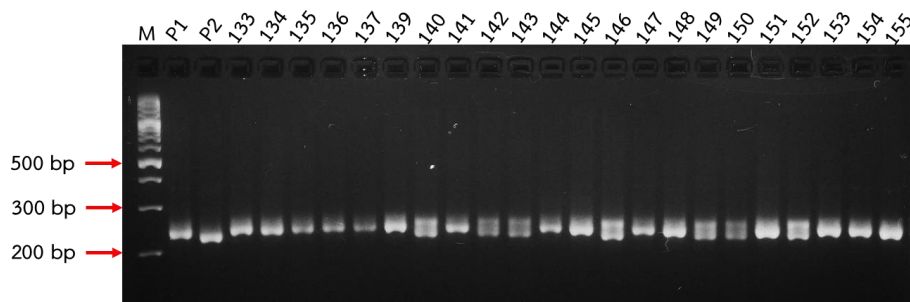
7.1.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*

จากผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* ในประชากร BC₁F₁ จำนวน 318 ต้น พบว่า สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ได้ โดยพบจีโนไทป์ 2 แบบ ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอ ดังนี้

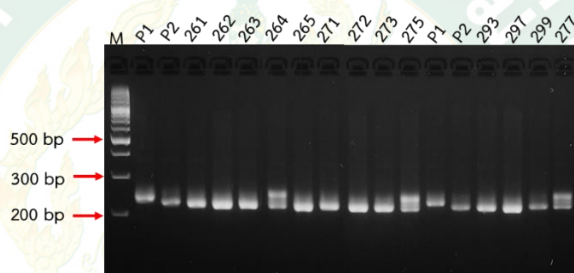
แบบที่ 1 PP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 มีขนาดประมาณ 228 คู่เบส

แบบที่ 2 KP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์ปทุมธานี 1 (P) และพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) อย่างละ 1 แถบ มีขนาดประมาณ 228 และน้อยกว่า 228 คู่เบส ตามลำดับ

ในประชากร BC₁F₁ พบจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM17321 แบบ PP จำนวน 151 ต้น และแบบ KP จำนวน 167 ต้น (ภาพที่ 34) อย่างไรก็ตาม ต้นที่ 21 ไม่พบแถบดีเอ็นเอ จึงทำการตรวจสอบซ้ำ นอกจากนี้ยังพบต้น BC₁F₁ ที่ไม่สามารถจำแนกจีโนไทป์ได้ชัดเจน คือ พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่มีขนาดเท่ากับพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) จำนวน 10 ต้น คือ ต้นที่ 261, 262, 263, 265, 271, 272, 273, 293, 297 และ 299 จึงได้ทำการตรวจสอบซ้ำ พบว่า ทั้ง 10 ต้นยังคงให้ผลเช่นเดิม (ภาพที่ 35)



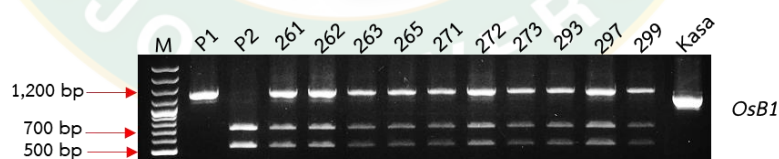
ภาพที่ 34 ตัวอย่างผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* บางส่วน จากประชากร BC_1F_1 จำนวน 318 ต้น ตัวเลข 133-155 คือ ต้นที่ 133-155, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



ภาพที่ 35 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* ในประชากร BC_1F_1 ครั้งที่ 2 จำนวน 10 ต้น ที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อยจำนวน 1 แถบ คือ ต้นที่ 261, 262, 263, 265, 271, 272, 273, 293, 297 และ 299, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับ ยีน *OsB1&B2* พบต้นในประชากร BC₁F₁ จำนวน 10 ต้น ได้แก่ ต้นที่ 261, 262, 263, 265, 271, 272, 273, 293, 297 และ 299 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ รับประทานที่ 1 คาดว่าต้น BC₁F₁ ดังกล่าว อาจเกิดจาก null (non-amplifying) alleles ซึ่งเป็นผลมาจากหลายสาเหตุ ได้แก่ เกิดความแตกต่างของลำดับเบสที่อยู่ขนานข้างลำดับเบสซ้ำ (Microsatellite) คุณภาพของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ หรืออาจเกิดการกลายพันธุ์ในบางจีโนไทป์ (Smulders et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า null alleles เกิดจากการที่ไพรเมอร์ไม่จับกับ ตำแหน่ง unique flanking sequence ของลำดับเบสซ้ำ (Microsatellite) (Priyadarshini et al., 2018) และเมื่อไม่นานมานี้ Tarang et al. (2020) รายงานว่า null alleles เกิดจากการขาดหายไปของลำดับเบสของอัลลีลบางชนิดในจีโนม อาจเกิดการขาดหายหรือช่องว่าง (gap) ระหว่างไพรเมอร์ที่ขนานข้างลำดับเบสซ้ำ ด้วยเหตุนี้ทำให้การตรวจสอบจีโนไทป์แบบ heterozygous ผิดพลาดเป็น homozygous ได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงนำต้น BC₁F₁ จำนวน 10 ต้น มาตรวจสอบจีโนไทป์ ด้วยเครื่องหมายชนิด CAPS ที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* (อนงค์นาฏ และคณะ 2564) (ภาพที่ 36) ผลปรากฏว่า ทุกต้นมีจีโนไทป์เป็นแบบ KP ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) เกิด null alleles จึงไม่พบแถบดีเอ็นเอของพันธุ์รับประทานที่ 1 แต่พบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับพันธุ์ให้ก้าน้อยเพียงแถบเดียว จากผลจีโนไทป์ของเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* จึงได้กำหนดจีโนไทป์ทั้ง 10 ต้นนี้ให้เป็นแบบ KP



ภาพที่ 36 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ที่จำเพาะกับยีน *OsB1* ในประชากร BC₁F₁ จำนวน 10 ต้น คือ ต้นที่ 261, 262, 263, 265, 271, 272, 273, 293, 297 และ 299, P1 คือ พันธุ์รับประทานที่ 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, Kasa คือ พันธุ์ Kasalath, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

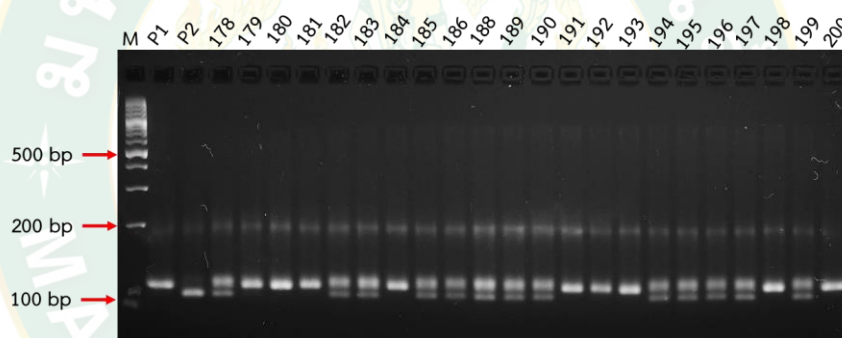
7.1.2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR*

จากผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 318 ต้น พบว่า สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ได้ โดยแถบดีเอ็นเอที่พบมีทั้งหมด 2 แบบ ดังนี้

แบบที่ 1 PP แถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับพุ่มธานี 1 แถบ มีขนาดประมาณ 124 คู่เบส

แบบที่ 2 KP แถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับพุ่มธานี 1 (P) และพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) มีขนาดประมาณ 124 และน้อยกว่า 124 คู่เบส

ในประชากร BC_1F_1 พบจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM17321 แบบ PP จำนวน 186 ต้น และแบบ KP จำนวน 132 ต้น (ภาพที่ 37)



ภาพที่ 37 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* บางส่วน จากประชากร BC_1F_1 จำนวน 318 ต้น ตัวเลข 178-200 คือ ต้นที่ 178-200, P1 คือ พันธุ์รับพุ่มธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

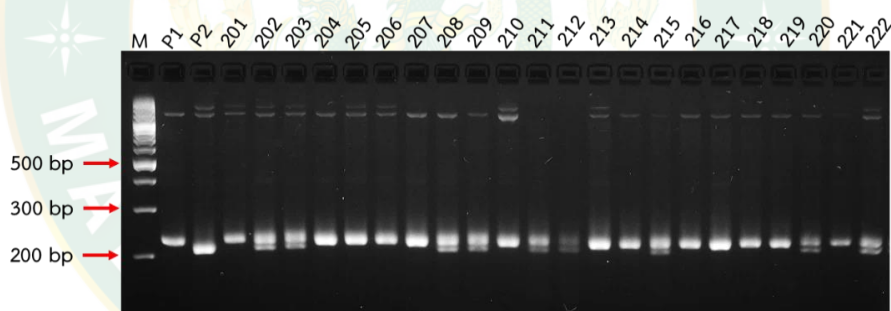
7.1.3. เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3*

จากผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* ในประชากร BC₁F₁ จำนวน 318 ต้น พบว่า สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ได้ โดยพบจีโนไทป์ 2 แบบ ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอ ดังนี้

แบบที่ 1 PP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 มีขนาดประมาณ 238 คู่เบส

แบบที่ 2 KP พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ ที่เหมือนกับพันธุ์รับปทุมธานี 1 (P) จำนวน 1 แถบ และพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) จำนวน 1 แถบ มีขนาดประมาณ 238 และน้อยกว่า 238 คู่เบส ตามลำดับ

ในประชากร BC₁F₁ พบจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM15209 แบบ PP จำนวน 172 ต้น และแบบ KP จำนวน 146 ต้น อย่างไรก็ตามพบต้นที่ 21 ไม่พบแถบดีเอ็นเอ จึงได้ทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้ง (ภาพที่ 38)



ภาพที่ 38 ตัวอย่างผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* บางส่วน จากประชากร BC₁F₁ จำนวน 318 ต้น ตัวเลข 201-222 คือ ต้นที่ 201-222, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

7.2. การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

การศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ RM17321, RM11383 และ RM15209 ตามลำดับ ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 318 ต้น โดยนำข้อมูลจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมาย จากข้อ 7.1 มาทดสอบไคสแควร์ มีสมมติฐาน คือ อัตราส่วนของจีโนไทป์ แบบ KP: PP เท่ากับ 1: 1 ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล ดังตาราง

จากการทดสอบไคสแควร์ในประชากร BC_1F_1 พบว่า การคำนวณค่าไคสแควร์ของเครื่องหมาย RM17321 และ RM15209 มีค่าเท่ากับ 0.805 และ 2.126 ตามลำดับ และ ค่า p-value มากกว่า 0.05 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าไคสแควร์ในตารางที่ค่า $df = 1$ ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.841 แสดงว่าการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 เป็นไปตามสมมติฐาน คือ อัตราส่วนจีโนไทป์ในประชากร BC_1F_1 เท่ากับ 1KP: 1PP ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 มีค่าเท่ากับ 9.170 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าไคสแควร์ในตาราง และค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ไม่เป็นไปตามสมมติฐานตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ในประชากร BC_1F_1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	ข้อมูล	จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ		ประชากรทั้งหมด	χ^2 (1KP: 1PP) $df = 1$	p-value
		KP	PP			
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	ค่าสังเกต	167	151	318	0.805	0.370
	ค่าคาดหวัง	159	159	318		
RM11383/ <i>OsDFR</i>	ค่าสังเกต	132	186	318	9.170	0.002
	ค่าคาดหวัง	159	159	318		
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	ค่าสังเกต	146	172	318	2.126	0.415
	ค่าคาดหวัง	159	159	318		

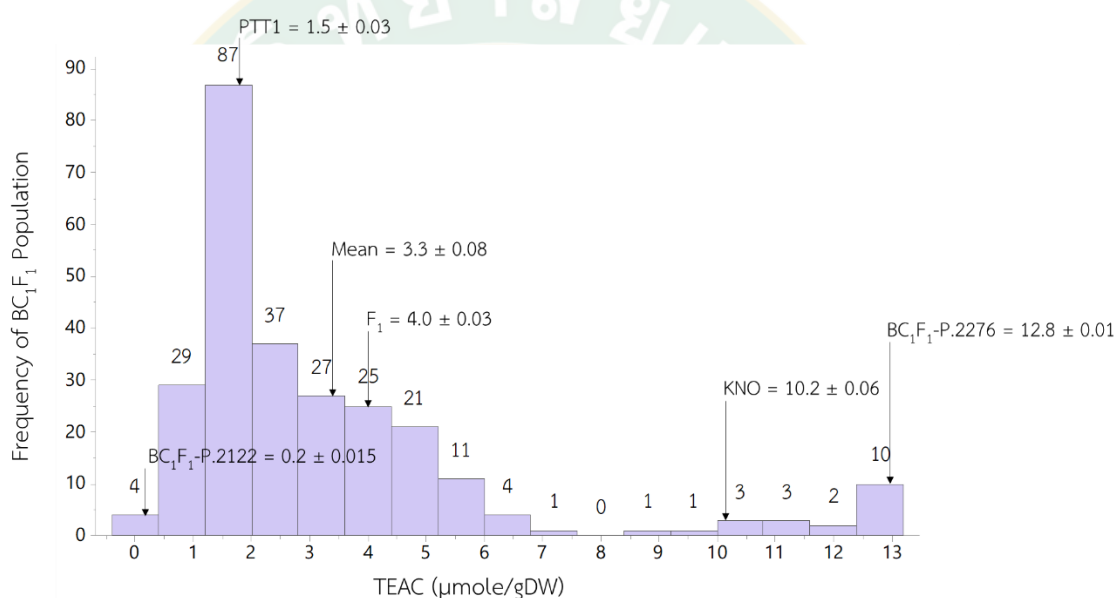
หมายเหตุ p-value > 0.05 ยอมรับสมมติฐาน และ p-value < 0.05 ปฏิเสธสมมติฐาน

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย (K) และพันธุ์รับปทุมธานี 1 (P),

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

7.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เมล็ดแก่ของต้นปทุมธานี 1, ก้าน้อย และ F_1 พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และ F_1 มีค่าเท่ากับ 1.5, 10.2 และ 4.0 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดแก่ (BC_1F_2) ของประชากร BC_1F_1 จำนวน 266 ต้น พบว่า การกระจายของค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.3 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง โดยต้นที่ BC_1F_1 -P.2122 (ต้น 122) มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 0.2 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง และต้นที่ BC_1F_1 -P.2276 (ต้น 294) มีค่าสูงสุด เท่ากับ 12.8 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวพันธุ์ให้ก้าน้อย (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 39 ฮิสโทแกรม (Histogram) แสดงการกระจายของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดข้าว ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 266 วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH รายงานผลในรูปของ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) หน่วย คือ ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง

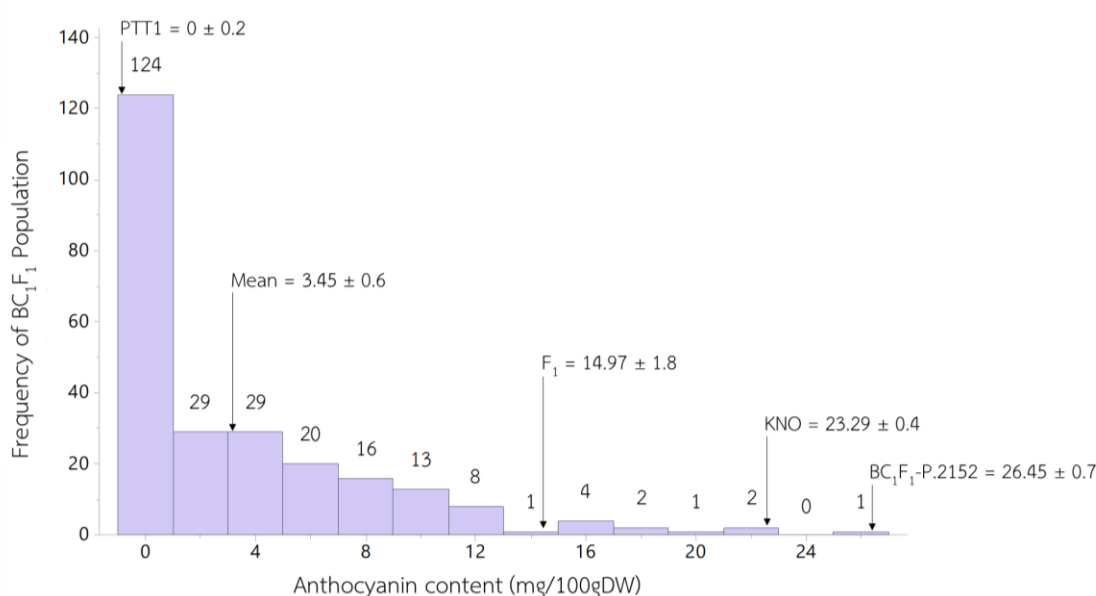
หมายเหตุ

PTT1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, KNO คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย,

P.2122 และ P.2276 คือ เมล็ด BC_1F_2 ต้นที่ 122 และ ต้นที่ 294 ตามลำดับ

7.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH Differential

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้เมล็ดแก่ของต้นปทุมธานี 1, กำน้อย และ F_1 พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินของพันธุ์ปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และ F_1 มีค่าเท่ากับ 0.00, 23.29 และ 14.97 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินของเมล็ดแก่ (BC_1F_2) ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 250 ต้น พบว่า มีการกระจายของค่าปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย เท่ากับ 3.45 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง และต้นที่ BC_1F_1 -P.2152 (ต้น 170) มีค่าสูงสุด เท่ากับ 26.45 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ซึ่งมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าพันธุ์ให้ก้าน้อย ส่วนต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวส่วนใหญ่ไม่พบปริมาณแอนโทไซยานิน (ภาพที่ 40)



ภาพที่ 40 ฮิสโทแกรม (Histogram) แสดงการกระจายของปริมาณแอนโทไซยานินของเมล็ดข้าว ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 255 ต้น วิเคราะห์ด้วยวิธี pH Differential หน่วย คือ มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมล็ดแห้ง P.2152 คือ เมล็ด BC_1F_2 ต้นที่ 170

หมายเหตุ

PTT1 คือ พันธุ์ปทุมธานี 1, KNO คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย,

P.2152 คือ เมล็ด BC_1F_2 ต้นที่ 170

7.5 การวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด

จากการวิเคราะห์และจำแนกสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร BC_1F_1 จำนวน 277 ต้น พบว่า สีเยื่อหุ้มเมล็ดมีทั้งหมด 3 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 สีขาวเหมือนพันธุรับ จำนวน 136 ต้น แบบที่ 2 สีน้ำตาลถึงดำ จำนวน 122 ต้น และแบบที่ 3 สีแดงปนดำและสีแดง จำนวน 19 ต้น (สีแดงปนดำ จำนวน 11 ต้น และสีแดง 8 ต้น) (ภาพที่ 41)

ทำการทดสอบค่าไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ด ด้วยโปรแกรม Minitab 18 โดยมี สมมติฐานประชากร BC_1F_1 คือ อัตราส่วนของสีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีและไม่มีสี เท่ากับ 1: 1 (Color: Colorless) พบว่า ค่าไคสแควร์ที่คำนวณได้ มีค่าเท่ากับ 0.090 ซึ่งมีความน้อยกว่าค่าไคสแควร์ในตาราง ที่ค่า $df = 1$ ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ 3.841 และค่า p-value มากกว่า 0.05 แสดงว่าการกระจาย ตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นไปตามสมมติฐาน คือ อัตราส่วนฟีโนไทป์มีสี: ไม่มีสี เป็น 1: 1 ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร BC_1F_1 สมมติฐาน อัตราส่วนฟีโนไทป์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ด มีสี: ไม่มีสี อัตราส่วนเท่ากับ 1: 1

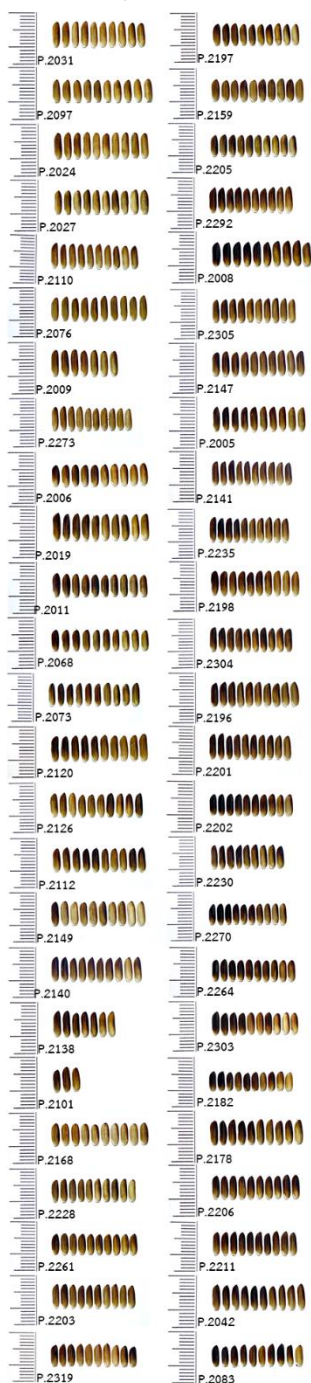
ข้อมูล	สีเยื่อหุ้มเมล็ด		จำนวน (ต้น)	χ^2 (1: 1)	p-value
	มีสี	ไม่มีสี			
ค่าสังเกต	141	136	277	0.090	0.764
ค่าคาดหวัง	138.5	138.5	277		

หมายเหตุ p-value > 0.05 ยอมรับสมมติฐาน และ p-value < 0.05 ปฏิเสธสมมติฐาน

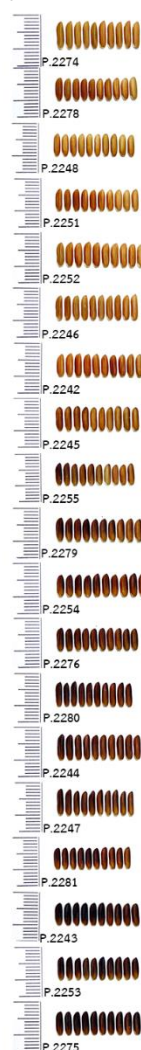
แบบที่ 1 เชื้อหุ้มเมล็ดสีขาว

P.2284	P.2285	P.2286	P.2287	P.2289	P.2291
P.2001	P.2049	P.2086	P.2130	P.2174	P.2226
P.2002	P.2050	P.2087	P.2131	P.2176	P.2229
P.2003	P.2051	P.2088	P.2132	P.2177	P.2231
P.2012	P.2052	P.2089	P.2133	P.2180	P.2233
P.2013	P.2054	P.2090	P.2135	P.2183	P.2237
P.2016	P.2055	P.2091	P.2136	P.2184	P.2238
P.2020	P.2056	P.2098	P.2137	P.2186	P.2240
P.2021	P.2059	P.2102	P.2139	P.2189	P.2241
P.2022	P.2060	P.2104	P.2142	P.2190	P.2249
P.2023	P.2061	P.2108	P.2145	P.2192	P.2257
P.2032	P.2063	P.2109	P.2146	P.2193	P.2258
P.2033	P.2064	P.2111	P.2148	P.2194	P.2262
P.2035	P.2065	P.2113	P.2153	P.2204	P.2265
P.2036	P.2066	P.2116	P.2154	P.2208	P.2266
P.2037	P.2067	P.2117	P.2156	P.2209	P.2267
P.2038	P.2069	P.2118	P.2157	P.2210	P.2268
P.2044	P.2075	P.2122	P.2158	P.2215	P.2269
P.2045	P.2078	P.2123	P.2160	P.2219	P.2271
P.2046	P.2079	P.2124	P.2172	P.2223	P.2282
P.2048	P.2080	P.2129	P.2173	P.2224	P.2283
P.2293	P.2294	P.2295	P.2297	P.2298	พันธุ์ 1
P.2302	P.2308	P.2320	P.2321	P.2301	

แบบที่ 2 เยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลถึงดำ



แบบที่ 3 เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดง

ภาพที่ 41 ลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวในประชากร BC₁F₁ ทั้งหมดจำนวน 258 ต้น

แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ แบบที่ 1 เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว 136 ต้น แบบที่ 2 เยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลถึงดำ

122 ต้น และแบบที่ 3 เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดง 19 ต้น

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของต้น BC₁F₁ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด

ลำดับที่	ข้าว	จีโนไทป์ของเครื่องหมาย ดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน			ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ปริมาณแอน โทไซยานิน	สีเยื่อหุ้ม เมล็ด
		<i>OsB1&B2</i>	<i>OsDFR</i>	<i>OsMYB3</i>			
-	PTT1	PP	PP	PP	1.5	0.00	ขาว
-	KNO	KK	KK	KK	10.2	23.29	ดำ
-	F ₁	KP	KP	KP	4.0	14.97	น้ำตาลเข้ม
A	P.2122	PP	PP	PP	0.2	0.00	ขาว
B	P.2276	KP	KP	KP	12.8	6.34	แดงปนดำ
C	P.2152	KP	PP	KP	9.3	26.45	ดำ
1	P.2242	KP	PP	KP	11.9	1.87	แดง
2	P.2243	KP	KP	KP	12.5	10.31	แดงปนดำ
3	P.2244	KP	PP	PP	10.3	2.41	แดงปนดำ
4	P.2246	KP	PP	PP	12.5	1.34	แดง
5	P.2247	KP	KP	PP	10.3	5.68	แดงปนดำ
6	P.2248	KP	KP	KP	11.3	3.17	แดง
7	P.2252	KP	KP	PP	12.4	1.77	แดง
8	P.2253	KP	PP	KP	12.7	9.06	แดงปนดำ
9	P.2254	KP	KP	KP	12.3	3.79	แดงปนดำ
10	P.2255	KP	PP	KP	12.6	5.11	แดงปนดำ
11	P.2274	KP	KP	PP	12.7	2.81	แดง
12	P.2275	KP	PP	KP	12.6	7.53	แดงปนดำ
13	P.2278	KP	PP	KP	12.5	2.65	แดง
14	P.2279	KP	PP	KP	12.7	5.10	แดงปนดำ
15	P.2280	KP	PP	PP	11.4	4.60	แดงปนดำ
16	P.2281	KP	PP	KP	11.3	4.42	แดงปนดำ

หมายเหตุ ลำดับที่ A คือ ต้น BC₁F₁-P.2122 ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด

ลำดับที่ B คือ ต้น BC₁F₁-P.2276 ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

ลำดับที่ C คือ ต้น BC₁F₁-P.2152 ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด

ลำดับที่ 1-16 คือ ต้น BC₁F₁ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าพันธุ์ให้ก้าน้อย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วิเคราะห์โดยวิธี DPPH หน่วย คือ ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง

ปริมาณแอนโทไซยานิน วิเคราะห์โดยวิธี pH Differential หน่วย คือ มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC₁F₁ พบต้น BC₁F₁-P.2276 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ 12.8 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าพันธุ์ให้ก้าน้อย และมีจีโนไทป์แบบ KP ทุกเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* และมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำ ในขณะที่ต้น BC₁F₁-P.2122 ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด เท่ากับ 0.2 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง มีจีโนไทป์แบบ PP ทุกเครื่องหมาย และมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ พบว่า มีต้น BC₁F₁ จำนวน 16 ต้น ที่มีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าพันธุ์ให้ก้าน้อย โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 12.7-10.3 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง พบว่า มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดง มีจีโนไทป์แบบ KP ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* ทุกต้น ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* และ *OsMYB3* กับค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่สอดคล้องกัน ดังนั้น คาดว่า การมีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) อย่างน้อย 1 อัลลีล อาจทำให้ต้น BC₁F₁ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น ดังตารางที่ 17

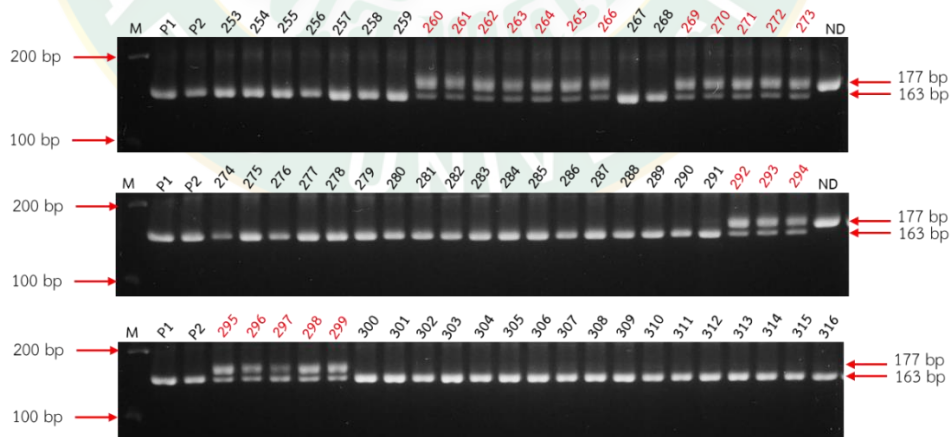
จากการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร BC₁F₁ พบต้น BC₁F₁-P.2152 มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด เท่ากับ 26.45 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าพันธุ์ให้ก้าน้อย มีจีโนไทป์แบบ KP PP KP ของเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ และมีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีดำ ดังนั้น คาดว่าการมีอัลลีล K จากพันธุ์ให้ก้าน้อย อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) อาจทำให้ต้น BC₁F₁ มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง และการมีอัลลีล K จากพันธุ์ให้ก้าน้อย อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมาย RM15209 (*OsMYB3*) อาจทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงขึ้น นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ยังพบปริมาณแอนโทไซยานินสะสมอยู่ในต้น BC₁F₁ ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและแดง โดยมีจีโนไทป์แบบ KP ของเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* ทุกต้น ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* และ *OsMYB3* กับปริมาณแอนโทไซยานินไม่สอดคล้องกัน ดังนั้น คาดว่าการมีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) อย่างน้อย 1 อัลลีล อาจทำให้ต้น BC₁F₁ มีการสะสมปริมาณแอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 17

จากการวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC₁F₁ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ต้น BC₁F₁ ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า ต้น BC₁F₁ ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลถึงดำ และขาว ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sompong et al. (2011); นิพัทธ์ และ ประมวล (2561); Muntana and Prasong (2010); Yuliana and Akhbar (2020) และ Min et al. (2012) ที่รายงานว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลและขาว ตามลำดับ

นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC_1F_1 กับปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่า ต้น BC_1F_1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลถึงดำมีปริมาณแอนโทไซยานินสะสมอยู่ ส่วนต้น BC_1F_1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ส่วนใหญ่ไม่พบปริมาณแอนโทไซยานิน มีเพียงบางต้นเท่านั้นที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสะสมอยู่เล็กน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mapan et al. (2014); Hosoda et al. (2018) และ Finocchiaro et al. (2010) ที่รายงานว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีปริมาณแอนโทไซยานินสะสมอยู่ แต่ไม่พบในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและขาว แต่อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ ต้น BC_1F_1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและแดง มีปริมาณแอนโทไซยานินสะสมอยู่ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vichit and Saewan (2015) และพบปริมาณแอนโทไซยานินในต้น BC_1F_1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำสูงกว่าต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ดังตารางที่ 17

7.6 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *OsRc*

เมื่อพิจารณาสีเยื่อหุ้มเมล็ดของประชากร BC_1F_1 ทั้งหมด จำนวน 318 ต้น พบว่ามีต้น BC_1F_1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและแดง ทั้งหมด จำนวน 19 ต้น ซึ่งสีแดงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดเกิดจากการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน โดยมียีนควบคุมสำคัญ คือ ยีน *OsRc* (Sweeney et al., 2006) ดังนั้นจึงนำเครื่องหมายชนิด InDel ที่จำเพาะต่อยีน *OsRc* มาตรวจสอบ ต้น BC_1F_1 ทั้งหมด จำนวน 318 ต้น (ภาพที่ 42) นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบพันธุ์รับพุ่มธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย ลูกผสม F_1 และประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น



ภาพที่ 42 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel ที่จำเพาะต่อยีน *OsRc* ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารโปรแอนโทไซยานินดินที่ทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวมีสีแดงในประชากร BC_1F_1 บางส่วน จากจำนวน 318 ต้น P1 คือ พันธุ์รับพุ่มธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, ND คือ พันธุ์เหนียวแดง และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ตัวเลข 253-316 คือ ประชากร BC_1F_1

จากผลการวิเคราะห์เครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน *OsRc* ในประชากร BC_1F_1 ทั้งหมด จำนวน 318 ต้น พบว่า มี 20 ต้น ที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous โดยพบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ ที่ขนาด 177 คู่เบส จำนวน 1 แถบ เหมือนกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง และพบแถบดีเอ็นเอที่ ขนาด 163 คู่เบส จำนวน 1 แถบ เหมือนกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและขาว แสดงว่า ต้น BC_1F_1 จำนวน 20 ต้นดังกล่าว อาจมีอัลลีล *Rc* ที่ทำงานได้ สอดคล้องกับเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงปนดำและสีแดง จำนวน 19 ต้น (มี 1 ต้น คือ ต้นที่ 295 ตายตั้งแต่ระยะกล้า จึงไม่สามารถวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ดได้) ดังนั้น คาดว่าการเกิดสีแดงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร BC_1F_1 อาจมาจากการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินของยีน *OsRc* อย่างไรก็ดีตาม การวิเคราะห์เครื่องหมายที่จำเพาะกับ ยีน *OsRc* ในข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย ลูกผสม F_1 และประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบจีโนไทป์แบบ homozygous recessive (*rc*) ทุกต้น ซึ่งสอดคล้องกับสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่ไม่พบเยื่อหุ้ม เมล็ดสีแดงปนดำและสีแดง

งานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีปริมาณแอนโทไซยานินสะสม อยู่ ส่วนข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีปริมาณโปรแอนโทไซยานินสะสมอยู่ นอกจากนี้ มีรายงานว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ มีทั้งสารแอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานินสะสมอยู่ด้วย (Min et al., 2012; Finocchiaro et al., 2010; Vichit and Saewan, 2015; Chen et al., 2016; Hosoda et al., 2018) ซึ่งข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่มีทั้งแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินสะสมอยู่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ดำ และขาว ตามลำดับ (Hosoda et al., 2018; Finocchiaro et al., 2010) ในงานวิจัยนี้ พบต้น BC_1F_1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง คาดว่าอาจเกิดจากทั้งแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินที่สะสมอยู่บริเวณ เยื่อหุ้มเมล็ดข้าว

เมื่อพิจารณาการเกิดเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดง จากการผสมข้ามพันธุ์ ระหว่างพันธุ์รับ คือ ปทุมธานี 1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว กับพันธุ์ให้ คือ ลูกผสม F_1 (ปทุมธานี 1 x ก้าน้อย) ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลเข้ม ในงานวิจัยนี้ คาดว่าเกิดขึ้นได้เช่นเดียวกับหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า เมื่อทำการผสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับดำ จะพบลูกผสมชั่วที่ 1, 2 และ 3 มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดงเกิดขึ้น แต่ไม่มีรายงานถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ด แดงว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร (Basunanda and Murti, 2019; Kristamtini et al., 2018; Mapan et al., 2014) นอกจากนี้ Oikawa et al. (2015) รายงานว่าข้าวดำมีบรรพบุรุษมาจากข้าวป่าพันธุ์ *Oryza rufipogon* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง โดยเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนผ่านการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ต่อมา Roy and Shil (2020) ได้ทำการผสมระหว่างข้าวป่าพันธุ์ *Oryza rufipogon* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ด สีแดง กับข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดง พบว่าในลูกผสมชั่วที่ 2, 3 และ 4 (F_2 , F_3 และ F_4) มีต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำเกิดขึ้น และได้รับการถ่ายทอดและคงไว้ในประชากร

8. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC_1F_1

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ คือ เครื่องหมาย RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ร่วมกับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ของประชากร BC_1F_1 ประกอบด้วย การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ด้วยวิธี ANOVA จากนั้นวิเคราะห์หาระดับและทิศทางความสัมพันธ์ด้วยวิธี Pearson correlation และวิเคราะห์ถดถอยโดยวิธี ถดถอยอย่างง่าย (Simple regression) และถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) การวิเคราะห์ข้อมูล กำหนดให้จีโนไทป์ของทุกเครื่องหมายแทนด้วยสัญลักษณ์ KP และ PP โดย K คือ อัลลีลของพันธุ์ให้ก้าน้อย และ P คือ อัลลีลของพันธุ์รับปทุมธานี 1

8.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ANOVA แบ่งออกเป็น 2 การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง ดังนี้

8.1.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ANOVA

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 266 ต้น จัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์โดยใช้วิธี Tukey พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ดังนั้นเครื่องหมาย RM17321 และ RM15209 จึงมีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ไม่สามารถจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ได้ และไม่มีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	จีโนไทป์	จำนวนประชากร F ₂	ฟีโนไทป์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ			
			ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KP	144	4.678	a	3.126	0.000*
	PP	122	1.557	b	0.721	
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KP	102	3.482	a	3.293	0.067 ^{ns}
	PP	164	2.966	a	2.455	
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KP	119	3.997	a	3.203	0.000*
	PP	147	2.639	b	2.300	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1

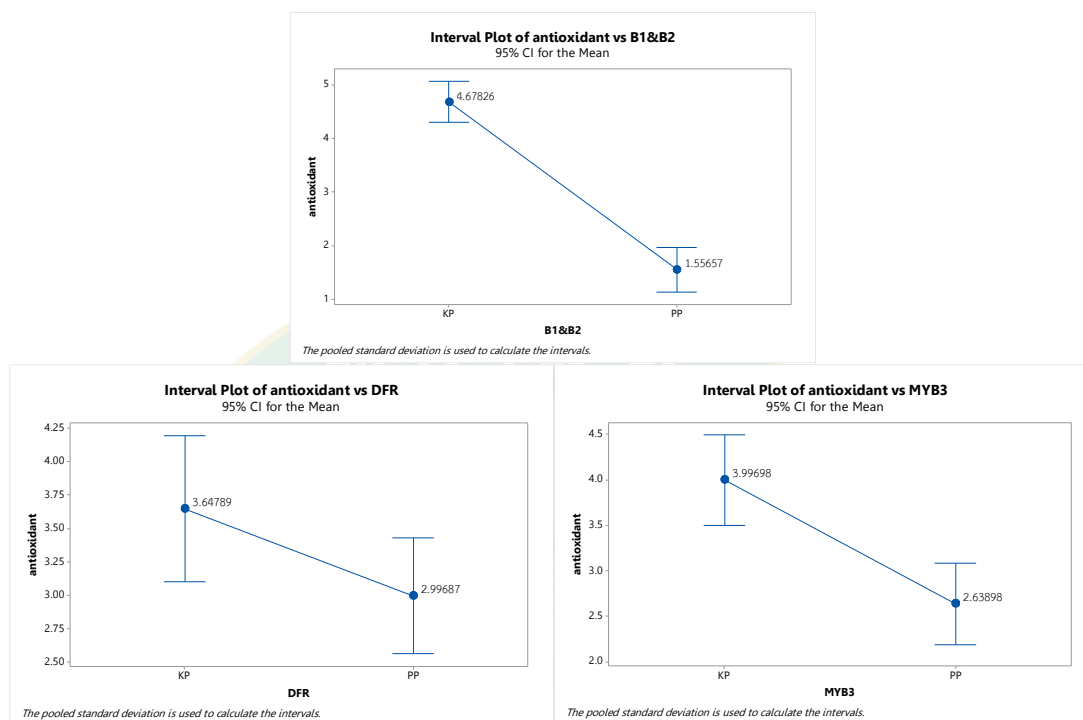
PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่ม a และ b ตามลำดับ ดังนั้น คาดว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถใช้ในการคัดเลือกลำต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 43)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้ตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกัน คือ กลุ่ม a ดังนั้น คาดว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีอิทธิพลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกลำต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 43)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่ม a และ b ตามลำดับ ดังนั้น คาดว่า

เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 43)



ภาพที่ 43 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์แบบ KP และ PP ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC₁F₁ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

8.1.2 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีนร่วมกัน 2 ตำแหน่ง กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ANOVA

จากการวิเคราะห์หาอิทธิพลความสัมพันธ์ ข้อ 8.1.1 พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น จึงได้ทำการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ 2 เครื่องหมายร่วมกัน คือ RM17321 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับจีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร BC₁F₁ จำนวน 266 ต้น และจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ด้วยวิธี Tukey พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 แบบ

ที่มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่ายีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* มีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC₁F₁

จีโนไทป์ RM17321 ร่วมกับ RM15209	จำนวน ประชากร F ₂	ฟีโนไทป์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ			
		ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
KPKP	74	5.464	a	3.236	0.000*
KPPP	70	3.848	b	2.795	
PPKP	45	1.584	c	0.754	
PPPP	77	1.540	c	0.701	

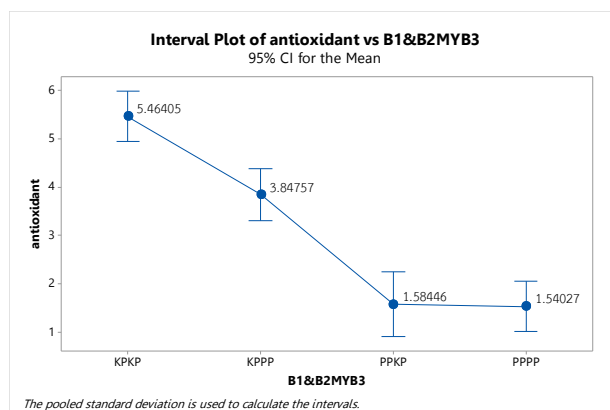
หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b, c คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ จำนวน 3 กลุ่ม ด้วยความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ได้แก่ กลุ่ม 1 (a) มีจีโนไทป์แบบ KPKP ที่มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด กลุ่ม 2 (b) มีจีโนไทป์แบบ KPPP ที่มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองลงมา และกลุ่ม 3 (c) มีจีโนไทป์แบบ PPKP และ PPPP ที่มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด

ดังนั้น การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คาดว่ามีอิทธิพลและความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าวที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยแยกกลุ่มตามจีโนไทป์ได้ชัดเจนจำนวน 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 (a) KPKP กลุ่ม 2 (b) KPPP และกลุ่ม 3 (c) PP__ แสดงว่า การไม่มีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ แต่ถ้ามีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 จำนวน 1 อัลลีล จะทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น นอกจากนี้ การมีอัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ อัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (ภาพที่ 44)



ภาพที่ 44 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์ จำนวน 4 แบบ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC_1F_1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

8.1.3 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Pearson correlation

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีระดับความสัมพันธ์ปานกลาง ค่า r เท่ากับ 0.553 และ p -value 0.000 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีระดับความสัมพันธ์ต่ำ ค่า r เท่ากับ 0.240 และ p -value 0.000 และมีทิศทางในเชิงบวก ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ค่า r เท่ากับ 0.113 และ p -value 0.067

8.1.4 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Simple regression

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของประชากร BC_1F_1 จำนวน 266 ต้น ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีถดถอยอย่างง่าย เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 30.59 และ 5.76 เปอร์เซนต์

ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ns) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 1.27 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R^2 (เปอร์เซ็นต์)	p-value
RM17321	<i>OsB1&B2</i>	4	30.59	0.000*
RM11383	<i>OsDFR</i>	1	1.27	0.067 ^{ns}
RM15209	<i>OsMYB3</i>	3	5.76	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

8.1.5 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Multiple regression

จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย ข้อ 8.1.4 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 สูงขึ้น เท่ากับ 32.69 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R^2 (เปอร์เซ็นต์)	p-value
RM17321 ร่วมกับ RM15209	<i>OsB1&B2</i> <i>OsMYB3</i>	4 3	32.69	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

8.2 ปริมาณแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี ANOVA แบ่งออกเป็น 2 การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง ดังนี้

8.2.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน

1 ตำแหน่ง กับปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี ANOVA

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน ในประชากร BC₁F₁ จำนวน 250 ต้น จัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ ด้วยวิธี Tukey พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินแตกต่างกัน ดังนั้นเครื่องหมาย RM17321 และ RM15209 จึงมีอิทธิพลกับปริมาณแอนโทไซยานิน แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ไม่สามารถจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ได้ และไม่มีอิทธิพลกับปริมาณแอนโทไซยานิน ได้ผลดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 1 เครื่องหมาย กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมาย/ ยีน	จีโนไทป์	จำนวน ประชากร F ₂	ฟีโนไทป์ ปริมาณแอนโทไซยานิน			
			ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KP	136	6.263	a	4.975	0.000*
	PP	114	0.101	b	0.221	
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KP	99	3.461	a	4.407	0.983 ^{ns}
	PP	151	3.448	a	5.032	
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KP	113	4.878	a	5.744	0.000*
	PP	137	2.278	b	3.416	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b, c คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

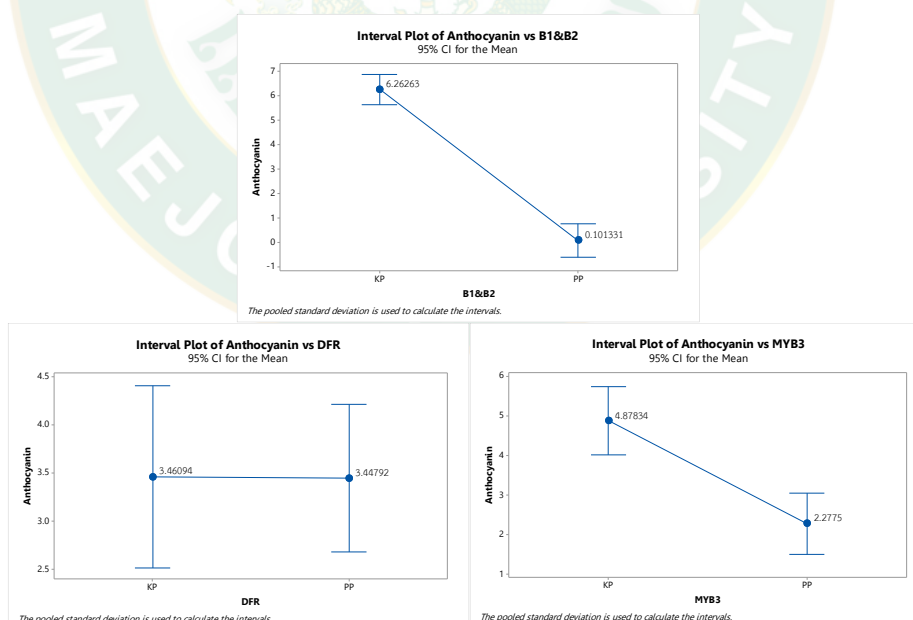
KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1 อย่างละ 1 แถบ

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* กับปริมาณแอนโทไซยานิน สามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจน 2 กลุ่ม ตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ดังนี้ จีโนไทป์แบบ KP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a และจีโนไทป์แบบ PP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม b ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อปริมาณแอนโทไซยานิน สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 45)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้ตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ดังนี้ จีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณแอนโทไซยานิน ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 45)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* กับปริมาณแอนโทไซยานินสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ดังนี้ จีโนไทป์แบบ KP จำนวน ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a และจีโนไทป์แบบ PP จัดอยู่ในกลุ่ม b ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อปริมาณแอนโทไซยานิน สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 45)



ภาพที่ 45 ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของจีโนไทป์แบบ KP และ PP ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC₁F₁ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

8.2.2 การวิเคราะห์หัตถิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน ร่วมกัน 2 ตำแหน่ง กับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี ANOVA

จากการวิเคราะห์หัตถิพลความสัมพันธ์ ข้อ 8.2.1 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* ไม่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ดังนั้น จึงได้ทำการวิเคราะห์หัตถิพลความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ 2 เครื่องหมายร่วมกัน คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 250 ต้น และจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ด้วยวิธี Tukey พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินแตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่า *OsB1&B2* และ *OsMYB3* มีอิทธิพลกับปริมาณแอนโทไซยานิน ได้ผลดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน ในประชากร BC_1F_1

จีโนไทป์ RM17321 ร่วมกับ RM15209	จำนวน ประชากร F_2	ฟีโนไทป์ ปริมาณแอนโทไซยานิน			
		ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
KPKP	70	7.785	a	5.566	0.000*
KPPP	66	4.648	b	3.658	
PPKP	43	0.146	c	0.279	
PPPP	71	0.074	c	0.173	

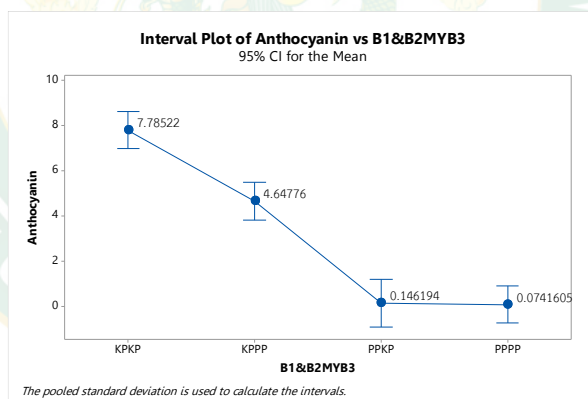
หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b, c คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1 อย่างละ 1 แถบ

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM1529 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานินสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ จำนวน 3 กลุ่ม ด้วยความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ได้แก่ กลุ่ม 1 (a) มีจีโนไทป์แบบ KPKP ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด กลุ่ม 2 (b) มีจีโนไทป์แบบ KPPP ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินสูงรองลงมา และกลุ่ม 3 (c) จีโนไทป์แบบ PPKP และ PPPP ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินต่ำที่สุด

ดังนั้น การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM1529 กับปริมาณแอนโทไซยานิน คาดว่ามีอิทธิพลและความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าวที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน โดยแยกกลุ่มตามจีโนไทป์ได้ชัดเจน จำนวน 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 (a) KPKP กลุ่ม 2 (b) KPPP และ กลุ่ม 3 (c) PP__ แสดงว่าการไม่มีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินต่ำ แต่ถ้ามีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 อย่างน้อย 1 อัลลีล จะทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงขึ้น นอกจากนี้ การมีอัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ อัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1529 จะทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด (ภาพที่ 46)



ภาพที่ 46 ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของจีโนไทป์ จำนวน 4 แบบ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM1529 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC₁F₁ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

8.2.3 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี Pearson correlation

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีระดับความสัมพันธ์ปานกลาง ค่า r เท่ากับ 0.643 และ p -value 0.000 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีระดับความสัมพันธ์ต่ำ ค่า r เท่ากับ 0.271 และ p -value 0.000 และมีทิศทางในเชิงบวกทั้ง 2 เครื่องหมาย ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ค่า r เท่ากับ 0.001 และ p -value 0.983

8.2.4 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี Simple regression

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของประชากร BC_1F_1 จำนวน 250 ต้น ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีนอลิก คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธีถดถอยอย่างง่าย เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 41.29 และ 7.35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ns) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับ ปริมาณแอนโทไซยานินของประชากร BC_1F_1

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R^2 (เปอร์เซ็นต์)	p -value
RM17321	<i>OsB1&B2</i>	4	41.29	0.000*
RM11383	<i>OsDFR</i>	1	0.00	0.983 ^{ns}
RM15209	<i>OsMYB3</i>	3	7.35	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

8.2.5 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี Multiple regression

จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย ข้อ 8.2.4 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ดังนั้นจึงวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 44.69 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากร BC_1F_1

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R^2 (เปอร์เซ็นต์)	p-value
RM17321 ร่วมกับ RM15209	<i>OsB1&B2</i> <i>OsMYB3</i>	4 3	44.69	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

8.3 สีเยื่อหุ้มเมล็ด

สำหรับการวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด กำหนดสีเยื่อหุ้มเมล็ดออกเป็น 3 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 สีขาว ให้คะแนนเป็น 0 แบบที่ 2 สีนํ้าตาลถึงดำ ให้คะแนนเป็น 1 และแบบที่ 3 สีแดงปนดำ และสีแดง ให้คะแนนเป็น 2

8.3.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ด้วยวิธี ANOVA

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ สีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 277 ต้น และจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ ด้วยวิธี Tukey พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมุติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่าง

น้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ดแตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่ายีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* มีอิทธิพลกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ไม่สามารถจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ได้ และไม่มีอิทธิพลกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ได้ผลดังตารางที่ 26

ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 1 เครื่องหมาย กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	จีโนไทป์	จำนวนประชากร BC ₁ F ₁	ฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ด			
			ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KP	146	1.096	a	0.395	0.000*
	PP	131	0.000	b	0.000	
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KP	107	0.664	a	0.672	0.066 ^{ns}
	PP	170	0.524	a	0.578	
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KP	125	0.672	a	0.645	0.021*
	PP	152	0.500	b	0.587	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

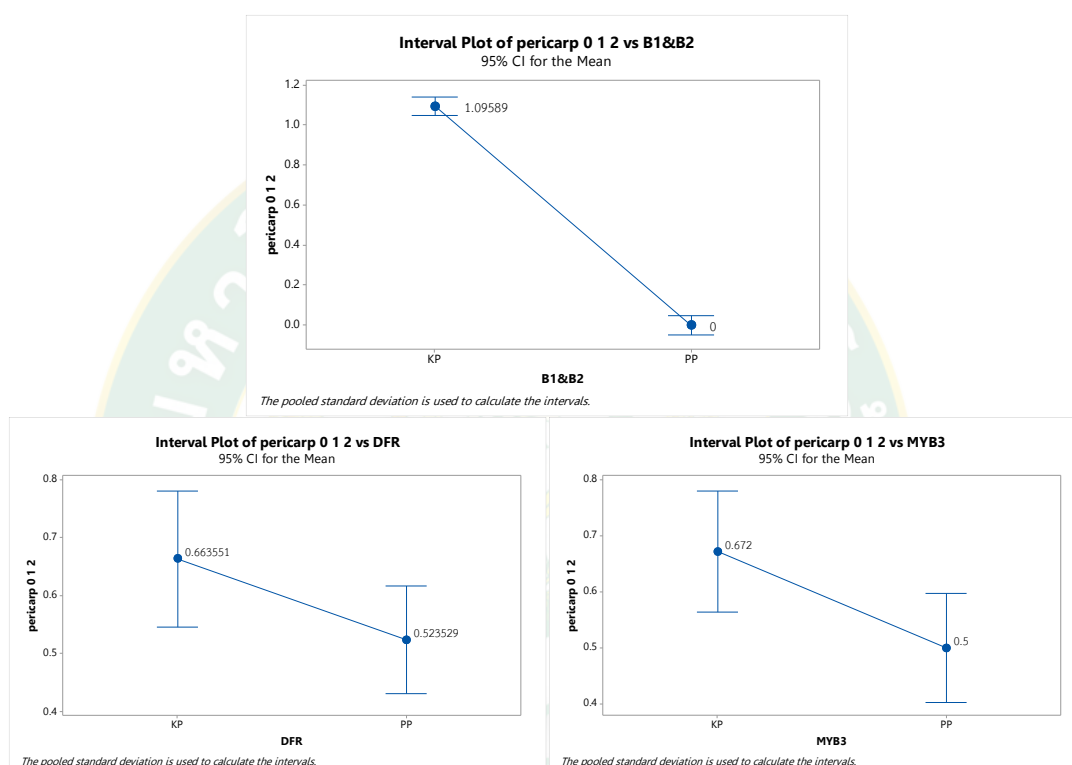
KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1 อย่างละ 1 แถบ

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจน 2 กลุ่ม ตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่ม a และ b ตามลำดับ ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 47)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้ตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีอิทธิพลต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 47)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่ม a และ b ตามลำดับ ดังนั้น คาดว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถใช้ในการคัดเลือก ต้นข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพที่ 47)



ภาพที่ 47 ค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ด ของจีโนไทป์แบบ KP และ PP ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC_1F_1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

8.3.2 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนร่วมกัน 2 ตำแหน่ง กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ด้วยวิธี ANOVA

จากการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ ข้อ 8.3.1 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* ไม่สัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ 2 เครื่องหมายร่วมกัน คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 กับฟีโนไทป์ คือ สีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 277 ต้น และจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ด้วยวิธี Tukey พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ด แตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่ายีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* มีอิทธิพลกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ได้ผลดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร BC_1F_1

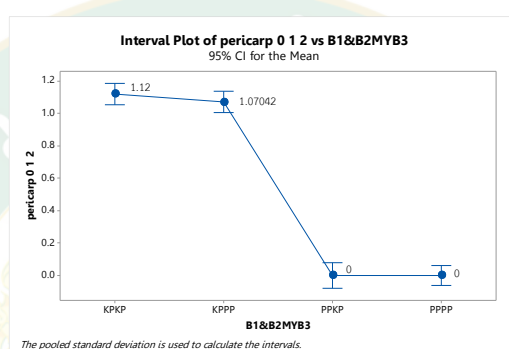
จีโนไทป์ RM17321 ร่วมกับ RM15209	จำนวนประชากร BC_1F_1	ฟีโนไทป์ สีเยื่อหุ้มเมล็ด			
		ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
KPKP	75	1.120	a	0.434	0.000*
KPPP	71	1.070	a	0.352	
PPKP	50	0.000	b	0.000	
PPPP	81	0.000	b	0.000	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1 อย่างละ 1 แถบ

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ จำนวน 2 กลุ่ม ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ได้แก่ กลุ่ม 1 (a) มีจีโนไทป์แบบ KPKP และ KPPP (หรือ KP_ _) และกลุ่ม 2 (b) มีจีโนไทป์แบบ PPKP และ PPPP (หรือ PP_ _) ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีอิทธิพลและความสำคัญในการคัดเลือกลักษณะที่สัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยการมีอัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 จะสามารถใช้คัดเลือกสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ (ภาพที่ 48)



ภาพที่ 48 ค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ดของจีโนไทป์จำนวน 4 แบบ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC₁F₁ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

8.3.3 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ด้วยวิธี Pearson correlation

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีระดับความสัมพันธ์สูงมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ค่า *r* เท่ากับ 0.886 และ *p*-value 0.000 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีระดับความสัมพันธ์ต่ำมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ค่า *r* เท่ากับ 0.139 และ *p*-value 0.021 และมีทิศทางในเชิงบวก ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ค่า *r* เท่ากับ 0.110 และ *p*-value 0.066

8.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฟีนไทป์

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างฟีนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับปานกลางกับปริมาณแอนโทไซยานิน ค่า r เท่ากับ 0.467 และ p -value 0.000

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างฟีนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสีเยื่อหุ้ม พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูงมาก ค่า r เท่ากับ 0.813 และ p -value 0.000

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างฟีนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานินกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับปานกลาง ค่า r เท่ากับ 0.556 และ p -value 0.000

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* กับฟีนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถสรุปได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 30.59 และ 41.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์สูงมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยมีค่า r เท่ากับ 0.886 และ RM15209 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 5.76 และ 7.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์ต่ำมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยมีค่า r เท่ากับ 0.139

เมื่อวิเคราะห์เครื่องหมาย RM17321 ร่วมกับ RM15209 พบว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน มีค่า R^2 เท่ากับ 32.69 และ 44.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฟีนไทป์ทั้งหมดในงานวิจัยนี้

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฟีนไทป์ พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์ปานกลางกับปริมาณแอนโทไซยานิน โดยมีค่า r เท่ากับ 0.467 และมีความสัมพันธ์สูงมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยมีค่า r เท่ากับ 0.813 นอกจากนี้ ปริมาณแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์ปานกลางกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยมีค่า r เท่ากับ 0.556 ดังตารางที่ 28

ตารางที่ 28 ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร BC₁F₁ วิเคราะห์โดยวิธี Pearson correlation วิธีการถดถอยอย่างง่าย และถดถอยพหุคูณ

จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์				
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		ปริมาณแอนโทไซยานิน		สีเยื่อหุ้มเมล็ด
	r	R ²	r	R ²	r
ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์					
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	0.553 (0.000*)	30.59 (0.000*)	0.643 (0.000*)	41.29 (0.000*)	0.886 (0.000*)
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	0.240 (0.000*)	5.76 (0.000*)	0.271 (0.000*)	7.35 (0.000*)	0.139 (0.021*)
RM17321 ร่วมกับRM15209	-	32.69 (0.000*)	-	44.69 (0.000*)	-
RM11383/ <i>OsDFR</i>	0.113 (0.067 ^{ns})	1.27 (0.067 ^{ns})	0.001 (0.983 ^{ns})	0.00 (0.983 ^{ns})	0.110 (0.066 ^{ns})
ความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์					
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	-	-	0.467 (0.000*)	-	0.813 (0.000*)
ปริมาณแอนโทไซยานิน	-	-	-	-	0.556 (0.000*)

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, ตัวเลขในวงเล็บ คือ ค่า p-value

8.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร BC₁F₁ เพิ่มเติม

จากการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายชนิด InDel ที่จำเพาะกับยีน *OsRc* ซึ่งเป็นยีนควบคุมสำคัญในการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และเป็นสารที่ทำให้เกิดสีแดงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ในข้อ 7.6 พบว่า มีต้น BC₁F₁ จำนวน 19 ต้น ที่มีอัลลีล *Rc* เด่น และมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดง คาดว่า ยีน *OsRc* ที่ทำงานได้อาจส่งผลให้เกิดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น ดังนั้น จึงไม่นำต้นที่มีอัลลีล *Rc* ที่ทำงานได้ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ เพื่อตัดอิทธิพลของยีน *OsRc* ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว แล้วทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์เพิ่มเติมของประชากร BC₁F₁ ประกอบด้วย การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ด้วยวิธี ANOVA จากนั้นวิเคราะห์หาระดับและทิศทางความสัมพันธ์ด้วยวิธี Pearson correlation และวิเคราะห์ถดถอยโดยวิธีถดถอยอย่างง่าย (Simple regression) และถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) การวิเคราะห์ข้อมูลกำหนดให้จีโนไทป์ของทุกเครื่องหมายแทนด้วยสัญลักษณ์ KP และ PP โดย K คือ อัลลีลของพันธุ์ให้ก้าน้อย และ P คือ อัลลีลของพันธุ์รับปทุมธานี 1

8.5.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า เครื่องหมาย RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* มีอิทธิพลความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ทุกลักษณะ โดยสามารถจัดกลุ่มได้ตามจีโนไทป์ คือ จีโนไทป์แบบ KP จัดอยู่กลุ่ม a และจีโนไทป์แบบ PP จัดอยู่กลุ่ม b ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* มีอิทธิพลความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน ($p < 0.05$) และสามารถจัดกลุ่มได้ตามจีโนไทป์โดย จีโนไทป์แบบ KP อยู่กลุ่ม a และจีโนไทป์แบบ PP อยู่กลุ่ม b แต่ไม่มีอิทธิพลความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ($p > 0.05$) นอกจากนี้ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีอิทธิพลกับฟีโนไทป์ทุกลักษณะที่ศึกษา ($p > 0.05$)

8.5.2 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ คือ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า มีความสัมพันธ์สูงในทิศทางเชิงบวกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน โดยมีค่า r เท่ากับ 0.659 และ 0.659 ตามลำดับ และมีความสัมพันธ์สูงมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยมีค่า r เท่ากับ 0.962

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ คือ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเหี่ยวหุ้มเมล็ด พบว่า มีความสัมพันธ์ต่ำกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน โดยมีค่า r เท่ากับ 0.287 และ 0.264 ตามลำดับ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับสีเหี่ยวหุ้มเมล็ด ($p\text{-value} > 0.05$) ดังตารางที่ 29

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ร่วมกัน พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์สูงในทิศทางเชิงบวกกับปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเหี่ยวหุ้มเมล็ด โดยมีค่า r เท่ากับ 0.799 และ 0.688 ตามลำดับ นอกจากนี้ ปริมาณแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์สูงกับสีเหี่ยวหุ้มเมล็ด โดยมีค่า r เท่ากับ 0.686 ดังตารางที่ 29

8.5.3 การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การถดถอยระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธีถดถอยอย่างง่ายและถดถอยพหุคูณระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน สามารถสรุปได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 43.47 และ 43.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ RM15209 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 8.23 และ 6.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์เครื่องหมาย RM17321 ร่วมกับ RM15209 พบว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน มีค่า R^2 เท่ากับ 47.63 และ 46.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ทั้งหมดในงานวิจัยนี้ ดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร BC_1F_1 เพิ่มเติม วิเคราะห์โดยวิธี Pearson correlation วิธีการถดถอยอย่างง่าย และถดถอยพหุคูณ

จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์				
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		ปริมาณแอนโทไซยานิน		สีเยื่อหุ้มเมล็ด
	r	R ²	r	R ²	r
ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์					
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	0.659 (0.000*)	43.47 (0.000*)	0.659 (0.000*)	43.38 (0.000*)	0.962 (0.000*)
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	0.287 (0.000*)	8.23 (0.000*)	0.264 (0.000*)	6.98 (0.000*)	0.103 (0.100 ^{ns})
RM17321 ร่วมกับ RM15209	- (0.000*)	47.63 (0.000*)	- (0.000*)	46.87 (0.000*)	-
RM11383/ <i>OsDFR</i>	-0.012 (0.853 ^{ns})	0.01 (0.853 ^{ns})	-0.007 (0.914 ^{ns})	0.01 (0.914 ^{ns})	0.033 (0.593 ^{ns})
ความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์					
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	-	-	0.799 (0.000*)	-	0.688 (0.000*)
ปริมาณแอนโทไซยานิน	-	-	-	-	0.686 (0.000*)

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, ตัวเลขในวงเล็บ คือ ค่า p-value
ประชากร BC_1F_1 ที่นำมาวิเคราะห์เพิ่มเติม คือ จำนวนต้นทั้งหมด ยกเว้น ต้นที่มีอัลลีล *Rc* เด่น จำนวน 19 ต้น

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยนำต้น BC_1F_1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว น้ำตาลถึงดำ แต่ไม่นำต้นที่มีอัลลีล *Rc* ที่ทำงานได้ ซึ่งมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำและสีแดงมาทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากตารางที่ 28 กับ ตารางที่ 29 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น มีค่า R^2 จากเดิม เท่ากับ 30.59 เพิ่มขึ้น เท่ากับ 43.47 เปอร์เซ็นต์ และมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินสูงขึ้น โดยค่า R^2 จากเดิม เท่ากับ 41.29 เพิ่มขึ้น เท่ากับ 46.87 เปอร์เซ็นต์ และมีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด สูงขึ้น โดยมีค่า r จากเดิม เท่ากับ 0.886 เพิ่มขึ้น เท่ากับ 0.962

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีความสัมพันธ์อย่างมากกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยคาดว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่เกิดจากแอนโทไซยานินที่ทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีดำ ซึ่งไม่มีอิทธิพลของยีน *OsRc* มาเกี่ยวข้อง และสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 เป็นเครื่องหมายหลักในการคัดเลือกลักษณะดังกล่าวในข้าวได้ และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีความสัมพันธ์กับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 8.23 และ 6.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้น สรุปได้ว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 เป็นเครื่องหมายรอง โดยอาจจะต้องใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออื่นร่วมกับเครื่องหมายหลัก RM17321 ถึงจะสามารถใช้คัดเลือกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวได้ (ตารางที่ 29)

การวิเคราะห์เครื่องหมาย RM17321 ร่วมกับ RM15209 พบว่า มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานินสูงขึ้น โดยค่า R^2 จากเดิมเท่ากับ 32.69 เพิ่มขึ้น เท่ากับ 47.63 เปอร์เซ็นต์ และมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินสูงขึ้น โดยค่า R^2 จากเดิม เท่ากับ 44.69 เพิ่มขึ้น เท่ากับ 46.87 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ไม่มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ($p\text{-value} > 0.05$) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับทุกลักษณะที่ศึกษา ($p\text{-value} > 0.05$) (ตารางที่ 29)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ร่วมกัน คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า ลักษณะดังกล่าวมีความสัมพันธ์กัน ($p\text{-value} < 0.05$) ดังนั้นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ จะมีปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

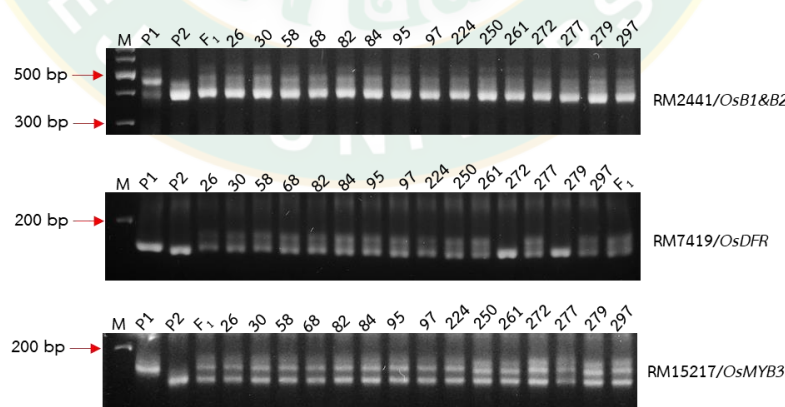
ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 เป็นเครื่องหมายหลักที่สามารถใช้คัดเลือกข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำได้ และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 เป็นเครื่องหมายรอง เมื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวร่วมกันจะสามารถคัดเลือกข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน ได้แม่นยำมากยิ่งขึ้น

9. การคัดเลือกต้น BC_1F_1 และผลิตเมล็ด BC_2F_1

9.1 การคัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ของทุกเครื่องหมาย และตรวจสอบด้วยเครื่องหมายที่ขนานอีกข้างหนึ่งของยีน

จากการคัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous (KP) จากประชากร BC_1F_1 จำนวน 318 ต้น ของทุกเครื่องหมาย คือ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ พบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่จะใช้เป็นพันธุ์ให้ในการสร้างประชากรผสมกลับครั้งที่ 2 ช่วงที่ 1 (BC_2F_1) ได้ทั้งหมด จำนวน 15 ต้น คือ ต้นที่ 26, 30, 58, 68, 82, 84, 95, 97, 224, 250, 261, 272, 277, 279 และ 297 ดังตารางที่ 30

นำต้นที่คัดเลือกได้จากประชากร BC_1F_1 จำนวน 15 ต้น มาตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ขนานอีกด้านหนึ่งของยีน คือ RM2441, RM7419 และ RM15217 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ เพื่อยืนยันว่าต้นที่คัดเลือกมานั้นได้รับยีนมาจากพันธุ์ก้าน้อย เพื่อให้การคัดเลือกต้นที่จะใช้เป็นพันธุ์ให้ในการผสมกลับไปหาพันธุ์รับปฐมฐานที่ 1 สำหรับสร้างประชากร BC_2F_1 มีความถูกต้องและแม่นยำ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM2441 และ RM15217 มีจีโนไทป์เป็นแบบ heterozygous (KP) ทุกต้น ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM7419 มีจีโนไทป์เป็นแบบ heterozygous (KP) จำนวน 13 ต้น ส่วนอีก 2 ต้น มีจีโนไทป์เหมือนกับพันธุ์ให้ก้าน้อยจำนวน 1 แถบ (K) คาดว่าเกิดจาก Null allele อาจเป็นผลมาจากความผิดพลาดของการเพิ่มจำนวนของตำแหน่งลำดับเบสซ้ำ หรือเกิดจากความแตกต่างบริเวณลำดับเบสทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ปฐมฐานที่ 1 ไม่พบ เช่นเดียวกับการเกิด Null allele ของเครื่องหมาย RM17321 ก่อนหน้านี้ (ภาพที่ 49)



ภาพที่ 49 การตรวจสอบจีโนไทป์ของต้นคัดเลือกจำนวน 15 ต้น ที่จะใช้เป็นพันธุ์ให้ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM2441 (*OsB1&B2*), RM7419 (*OsDFR*) และ RM15217 (*OsMYB3*), P1 คือ พันธุ์รับปฐมฐานที่ 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, ตัวเลข 26-297 คือ ต้นคัดเลือกที่จะใช้เป็นพันธุ์ให้,

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

ตารางที่ 30 การคัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous (KP) จากประชากร BC₁F₁ จำนวน 15 ต้น ด้วยเครื่องหมายขนานทั้งสองข้างของยีน *OsB1&B2* (RM17321 และ RM2441), *OsDFR* (RM11383 และ RM7419), และ *OsMYB3* (RM15209 และ RM15217), ตามลำดับ

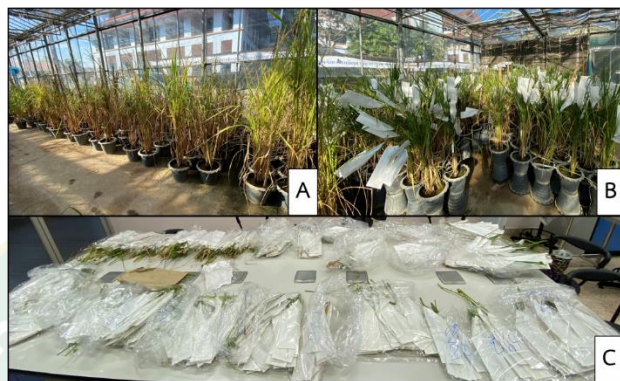
ลำดับที่	plot ที่	ต้นที่	จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ					
			<i>OsB1&B2</i>		<i>OsDFR</i>		<i>OsMYB3</i>	
			RM17321	RM2441	RM11383	RM7419	RM15209	RM15217
1	2026	26	KP	KP	KP	KP	KP	KP
2	2030	30	KP	KP	KP	KP	KP	KP
3	2058	58	KP	KP	KP	KP	KP	KP
4	2068	68	KP	KP	KP	KP	KP	KP
5	2082	82	KP	KP	KP	KP	KP	KP
6	2084	84	KP	KP	KP	KP	KP	KP
7	2095	95	KP	KP	KP	KP	KP	KP
8	2097	97	KP	KP	KP	KP	KP	KP
9	2206	224	KP	KP	KP	KP	KP	KP
10	2232	250	KP	KP	KP	KP	KP	KP
11	2243	261	KP	KP	KP	KP	KP	KP
12	2254	272	KP	KP	KP	K_	KP	KP
13	2259	277	KP	KP	KP	KP	KP	KP
14	2261	279	KP	KP	KP	K_	KP	KP
15	2279	297	KP	KP	KP	KP	KP	KP

หมายเหตุ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ให้ผลแถบดีเอ็นเอ ของต้นที่ 261, 272 และ 297 จำนวน 1 แถบ เหมือนพันธุ์ก้าน้อย แต่เมื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM2441 ที่ยึดติดอีกข้างหนึ่งของยีน และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* พบว่าให้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ เหมือนปทุมธานี 1 จำนวน 1 แถบ และก้าน้อย จำนวน 1 แถบ จึงเขียนจีโนไทป์เป็น KP

เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM7419 ที่ขนานอีกข้างหนึ่งของยีน *OsDFR* พบว่า ต้นที่ 272 และ 279 ให้ผลแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ เหมือนพันธุ์ก้าน้อย จึงเขียนจีโนไทป์เป็น K_

9.2 การผลิตเมล็ดข้าวผสมกลับครั้งที่ 2 ช่วงที่ 1 (BC_2F_1)

ผลิตเมล็ด BC_2F_1 โดยนำพันธุ์ให้ BC_1F_1 จำนวน 15 ต้นที่คัดเลือกมาจากข้อ 9.1 ผสมกลับไปยังพันธุ์ปทุมธานี 1 ในฤดูนาปี 2564 (กรกฎาคม – ธันวาคม) ทำการผสมทั้งหมด จำนวน 15 คู่ผสม ผลิตเมล็ด BC_2F_1 ได้ดังภาพที่ 50 และตารางที่ 31



ภาพที่ 50 การผลิตเมล็ด BC_2F_1 ด้วยวิธีผสมกลับ (A) ต้นคัดเลือกจากประชากร BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จำนวน 15 ต้น (B) การผสมข้าวเพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1 บนต้นปทุมธานี 1 ที่ใช้เป็นพันธุ์รับ จำนวน 15 คู่ผสม (C) จำนวนเมล็ด BC_2F_1 ที่ผลิตได้ในฤดูนาปี 2563

ตารางที่ 31 เมล็ด BC_2F_1 ที่ได้จากการผสมกลับทั้งหมด 15 คู่ผสม โดยใช้ต้น BC_1F_1 ที่คัดเลือกได้จำนวน 15 ต้น เป็นพันธุ์ให้ ผลได้ในฤดูนาปี 2563

คู่ผสมที่	พันธุ์ให้ BC_1F_1		จำนวนเมล็ด BC_2F_1
	plot ที่	ต้นที่	
1	2026	26	108
2	2030	30	359
3	2058	58	125
4	2068	68	209
5	2082	82	50
6	2084	84	62
7	2095	95	125
8	2097	97	121
9	2206	224	79
10	2232	250	61
11	2243	261	296
12	2254	272	152
13	2259	277	85
14	2261	279	220
15	2279	297	248

หลังจากสร้างประชากร BC_2F_1 ปลอຍให้ต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ติดเมล็ด เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_2 จากนั้นนำเมล็ดแก่ไปวิเคราะห์ฟีโนไทป์ ได้แก่ สีเยื่อหุ้มเมล็ด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ บันทึกลักษณะสีของกาบใบ เยื่อกันน้ำฝน เชื้อวุ้นแมลง ยอด เกสรเพศเมีย และปลายกลีบดอกใหญ่

9.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

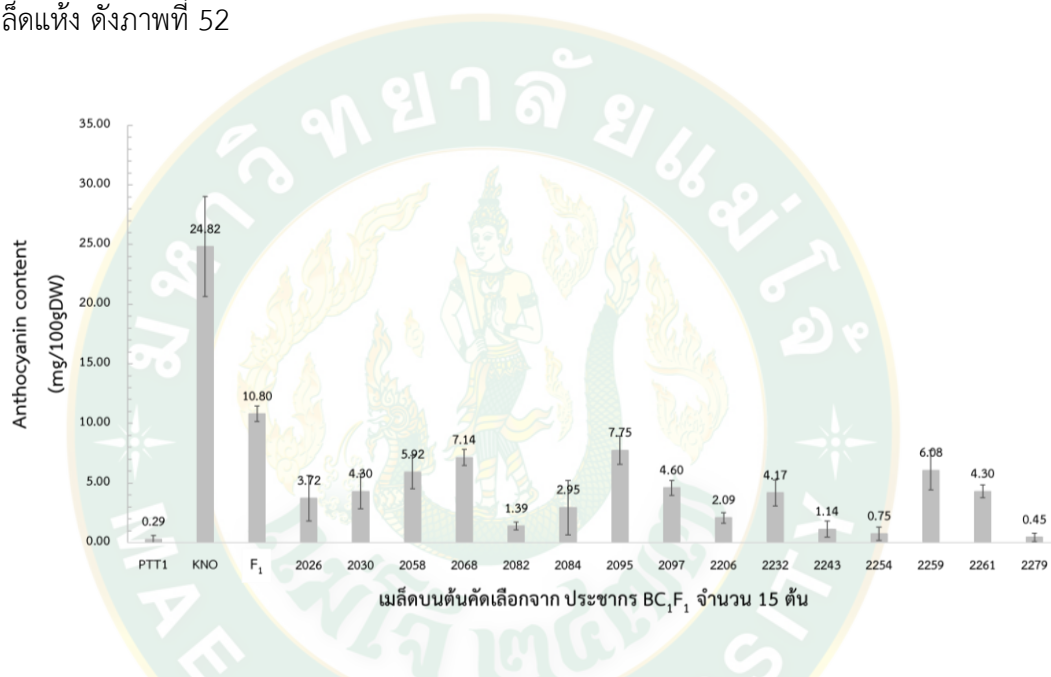
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เมล็ดแก่ (BC_1F_2) บนต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ คัดเลือกมาจากประชากร BC_1F_1 จำนวน 321 ต้น โดยวิธี DPPH พบว่า พันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และ F_1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 1.7, 8.4 และ 4.1 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์เมล็ดของต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยต้นที่มีค่าสูงที่สุด คือ BC_1F_1 -P.2279 เท่ากับ 12.7 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง และต้นที่มีค่าต่ำที่สุด คือ BC_1F_1 -P.2206 เท่ากับ 1.8 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ดังภาพที่ 51



ภาพที่ 51 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสกัดจากเมล็ดข้าวของต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จำนวน 15 ต้น วิเคราะห์โดยวิธี DPPH หน่วย คือ ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง
PTT1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, KNO คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย

9.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้เมล็ดแก่ (BC_1F_2) บนต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ คัดเลือกมาจากประชากร BC_1F_1 จำนวน 321 ต้น โดยวิธี pH Differential พบว่า พันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และ F_1 มีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 0.29, 24.82 และ 10.80 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์เมล็ดของต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ พบว่า มีปริมาณแอนโทไซยานิน โดยต้นที่มีค่าสูงที่สุด คือ BC_1F_1 -P.2095 เท่ากับ 7.75 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง และต้นที่มีค่าต่ำที่สุด คือ BC_1F_1 -P.2279 เท่ากับ 0.45 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ดังภาพที่ 52



ภาพที่ 52 ปริมาณแอนโทไซยานินสกัดจากเมล็ดข้าวของต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จำนวน 15 ต้น วิเคราะห์โดยวิธี pH Differential หน่วย คือ มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง

PTT1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, KNO คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย

9.5 การวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ดบนต้นคัดเลือก BC₁F₁

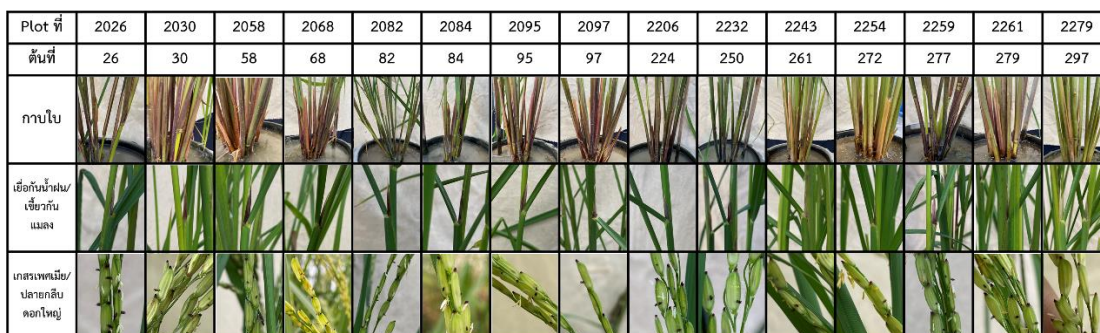
จากการวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด BC₁F₂ ของต้นคัดเลือกต้น BC₁F₁ จำนวน 15 ต้น ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ พบว่า plot ที่ 2026, 2082, 2084, 2206 และ 2259 มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลเข้ม ส่วน plot ที่ 2030, 2058, 2068, 2095, 2097, 2232, 2259 และ 2261 มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ นอกจากนี้พบว่า plot ที่ 2243, 2254 และ 2279 มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำ ดังภาพที่ 53



ภาพที่ 53 สีเยื่อหุ้มเมล็ด BC₁F₂ บนต้น BC₁F₁ ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จำนวน 15 ต้น

9.6 การวิเคราะห์ฟีโนไทป์ของต้นคัดเลือก BC₁F₁ ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้

จากการวิเคราะห์ฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะกาบใบ (Leaf sheath) เยื่อกันน้ำฝน (Ligule) และเขี้ยวกันแมลง (Auricle) เกสรเพศเมีย (Stigma) และปลายกลีบดอกใหญ่ (Apiculus) พบว่า ส่วนใหญ่มีกาบใบสีม่วง ยกเว้น ต้นที่ 261 (P.2243) มีกาบใบสีม่วงอ่อน และต้น 272 (P.2254) และ 297 (P.2279) มีกาบใบสีเขียว ลักษณะเยื่อกันน้ำฝน เขี้ยวกันแมลง เกสรเพศเมีย และปลายกลีบดอกใหญ่ มีสีม่วงทุกต้น ดังภาพที่ 54 และตารางที่ 32



ภาพที่ 54 ฟีนไทป์ของต้นคัดเลือก BC₁F₁ ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้จำนวน 15 ต้น ได้แก่ ลักษณะกาบใบ เยื่อแก่น้ำฝน เขียวกันแมลง เกสรเพศเมีย (Stigma) และปลายกลีบดอกใหญ่ (Apiculus)

ตารางที่ 32 การวิเคราะห์ฟีนไทป์ของต้นคัดเลือก BC₁F₁ ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้จำนวน 15 ต้น

ลำดับที่	plot ที่	ต้นที่	ฟีนไทป์ของต้น BC ₁ F ₁ ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้					
			ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	ปริมาณแอนโทไซยานิน	สีเยื่อหุ้มเมล็ด	กาบใบ	เยื่อแก่น้ำฝน/เขียวกันแมลง	เกสรเพศเมีย/ปลายกลีบดอก
-	-	PTT1	1.7	0.29	ขาว	ขาว	เขียว	ขาว
-	-	KNO	8.4	24.82	ดำ	ม่วง	ม่วง	ม่วง
-	-	F ₁	4.1	10.80	น้ำตาลเข้ม	ม่วง	ม่วง	ม่วง
1	2026	26	2.0	3.72	น้ำตาลเข้ม	ม่วง	ม่วง	ม่วง
2	2030	30	2.8	4.30	ดำ	ม่วง	ม่วง	ม่วง
3	2058	58	3.7	5.92	ดำ	ม่วง	ม่วง	ม่วง
4	2068	68	4.1	7.14	ดำ	ม่วง	ม่วง	ม่วง
5	2082	82	3.1	1.39	น้ำตาลเข้ม	ม่วง	ม่วง	ม่วง
6	2084	84	2.8	2.95	น้ำตาลเข้ม	ม่วง	ม่วง	ม่วง
7	2095	95	4.7	7.75	ดำ	ม่วง	ม่วง	ม่วง
8	2097	97	4.5	4.60	ดำ	ม่วง	ม่วง	ม่วง
9	2206	224	1.8	2.09	น้ำตาลเข้ม	ม่วง	ม่วง	ม่วง
10	2232	250	2.1	4.17	ดำ	ม่วง	ม่วง	ม่วง
11	2243	261	9.7	1.14	แดงปนดำ	ม่วงอ่อน	ม่วง	ม่วง
12	2254	272	8.2	0.75	แดงปนดำ	เขียว	ม่วง	ม่วง
13	2259	277	2.3	6.08	น้ำตาลเข้ม	ม่วง	ม่วง	ม่วง
14	2261	279	4.4	4.30	ดำ	ม่วง	ม่วง	ม่วง
15	2279	297	12.7	0.45	แดงปนดำ	เขียว	ม่วง	ม่วง

หมายเหตุ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หน่วย คือ คีโ ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง และ
แอนโทไซยานิน หน่วย คือ มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง

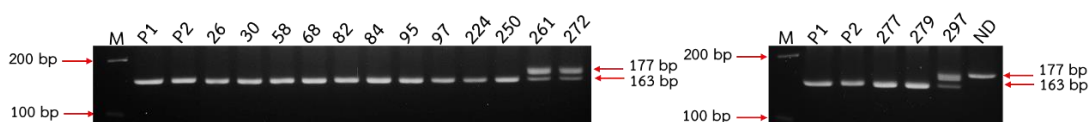
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นคัดเลือก BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้จำนวน 15 ต้น พบว่า ต้นที่ P.2279 (12.7 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง) และ P.2243 (9.7 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าพันธุ์ให้ก้าน้อย (8.4 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง) และต้นที่ P.2254 (8.2 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับพันธุ์ให้ก้าน้อย และทั้ง 3 ต้นดังกล่าวมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลถึงดำ จำนวน 12 ต้น (มีค่าระหว่าง 1.8 - 4.7 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง) (ตารางที่ 32)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินของต้นคัดเลือก BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้จำนวน 15 ต้น พบว่า มีจำนวน 12 ต้น ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลถึงดำ (มีค่าระหว่าง 1.39 - 7.75 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง) และมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำ จำนวน 3 ต้น (มีค่าระหว่าง 0.45 - 1.14 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง) แต่อย่างไรก็ตาม พันธุ์ให้ก้าน้อยมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด (24.82 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง) (ตารางที่ 32)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี Pearson correlation ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของพันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย เมล็ดบนต้น F_1 และเมล็ดของต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ จำนวน 15 ต้น พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า r เท่ากับ 0.115 และ p -value เท่ากับ 0.650 (ns) อาจเนื่องจากมีต้น BC_1F_1 จำนวน 3 ต้น ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงแต่มีปริมาณแอนโทไซยานินต่ำ เป็นผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยคาดว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำ อาจเกิดจากสารโปรแอนโทไซยานิน ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะต้น BC_1F_1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลเข้มถึงดำ พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์สูงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทิศทางเชิงบวก มีค่า r เท่ากับ 0.879 และ p -value เท่ากับ 0.000 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนั้น ต้น BC_1F_1 ที่มีแอนโทไซยานินสะสมบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดมากคาดว่าจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hosoda et al., (2018) ที่รายงานว่าปริมาณแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ

จากการวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ดของต้นคัดเลือก BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้จำนวน 15 ต้น พบเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลถึงดำ จำนวน 13 ต้น และเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำ จำนวน 3 ต้น (ตารางที่ 32) มีรายงานว่าสีแดงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดเกิดจากการสะสมของโปรแอนโทไซยานิน ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนควบคุมสำคัญ คือ *OsRc* ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel ที่จำเพาะกับยีน *OsRc* (Sweeney et al., 2006) พบว่า ต้นคัดเลือก BC_1F_1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำ จำนวน 3 ต้น พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ที่ขนาด 177 คู่เบส จำนวน 1 แถบ ที่มีขนาดเท่ากับ

ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง และพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 163 คู่เบส จำนวน 1 แถบ ที่มีขนาดเท่ากับ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและขาว (ภาพที่ 55) แสดงว่าอาจมีการทำงานของอัลลีล *Rc* เกิดขึ้น ดังนั้น คาดว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้น BC_1F_1 จำนวน 3 ต้น ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำอาจมาจากทั้ง แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิน



ภาพที่ 55 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel ที่จำเพาะต่อยีน *OsRc* ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารโปรแอนโทไซยานินที่ทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวมีสีแดงของต้น BC_1F_1 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้จำนวน 15 ต้น P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, ND คือ พันธุ์เหนียวแดง และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsB1*, *OsB2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 4, 4, 1 และ 3 ตามลำดับ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับทั้ง 4 ยีน บนฐานข้อมูล Gramene พบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* จำนวน 22, 24 และ 22 เครื่องหมาย ตามลำดับ คัดเลือกเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอเป็นแบบ polymorphic สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้ จำนวน 5, 6 และ 7 เครื่องหมาย ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 1 เครื่องหมาย ต่อ 1 ยีน ที่ให้แถบดีเอ็นเอแถบเดียว (single band) ที่มีขนาดต่างกันชัดเจนระหว่างพันธุ์รับและพันธุ์ให้ และสามารถตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) และ RM15209 (*OsMYB3*)

การตรวจสอบประชากร F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) และ RM15209 (*OsMYB3*) และการวิเคราะห์ไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายในประชากร F_2 โดยมีสมมติฐาน คือ อัตราส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายเท่ากับ 1(KK): 2(KP): 1(PP) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ($\chi^2 = 0.731$, p-value = 0.700), RM11383 ($\chi^2 = 1.520$, p-value = 0.468) และ RM15209 ($\chi^2 = 1.760$, p-value = 0.415) เป็นไปตามสมมติฐาน ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากเมล็ดแก่ของประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น โดยพันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และ F_1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 1.6, 10.1 และ 4.8 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ และพบว่า ต้น F_2 ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง คือ ต้นที่ F_2-2 และ F_2-13 มีค่าเท่ากับ 9.7 และ 9.5 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ให้ก้าน้อย พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยทั้ง 2 ต้นนี้มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) และ RM15209 (*OsMYB3*) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ANOVA ในประชากร F_2 พบว่า เครื่องหมาย RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มีค่า p-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มีความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าวที่สัมพันธ์กับ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 (*OsDFR*) ไม่มีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์หาระดับและทิศทางความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยวิธี Pearson correlation ในประชากร F_2 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) มีระดับความสัมพันธ์สูงในทิศทางเชิงบวก ($r = 0.643$, $p\text{-value} = 0.000$) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (*OsMYB3*) มีระดับความสัมพันธ์ต่ำในทิศทางเชิงบวก ($r = 0.249$, $p\text{-value} = 0.000$) แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 (*OsDFR*) ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($r = 0.092$, $p\text{-value} = 0.110$)

การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย (Simple regression) ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร F_2 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 41.30 และ 6.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) ร่วมกับ RM15209 (*OsMYB3*) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่า R^2 มีค่าสูงขึ้น เท่ากับ 46.64 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) เป็นเครื่องหมายหลัก และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (*OsMYB3*) เป็นเครื่องหมายรอง สามารถใช้คัดเลือกข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

การตรวจสอบประชากร BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) และ RM15209 (*OsMYB3*) และการวิเคราะห์ไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายในประชากร BC_1F_1 โดยมีสมมติฐาน คือ อัตราส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายเท่ากับ 1(KP): 1(PP) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ($\chi^2 = 0.805$, $p\text{-value} = 0.370$) และ RM15209 ($\chi^2 = 2.126$, $p\text{-value} = 0.415$) เป็นไปตามสมมติฐาน ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ($\chi^2 = 9.170$, $p\text{-value} = 0.002$) ไม่เป็นไปตามสมมติฐาน

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากเมล็ดแก่ของประชากร BC_1F_1 จำนวน 266 ต้น โดยพันธุ์รับพุ่มธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และ F_1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ เท่ากับ 1.5, 10.2 และ 4.0 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ และพบว่าต้นที่ BC_1F_1 -P.2122 มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 0.2 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง ซึ่งมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และต้นที่ BC_1F_1 -P.2276 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 12.8 ไมโครโมลต่อกรัมเมล็ดแห้ง มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงปนดำ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวพันธุ์ก้าน้อย

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH Differential จากเมล็ดแก่ของประชากร BC₁F₁ จำนวน 250 ต้น โดยพันธุ์รับปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ก้าน้อย และ F₁ มีปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 0.00, 23.29 และ 14.97 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ และพบว่าต้นที่ BC₁F₁-P.2152 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 26.45 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ซึ่งมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าข้าวพันธุ์ก้าน้อย

การวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ดของประชากร BC₁F₁ จำนวน 277 ต้น พบว่า จำแนกสีเยื่อหุ้มเมล็ด ออกเป็น 3 แบบ คือ แบบที่ 1 สีขาว แบบที่ 2 สีน้ำตาลถึงสีดำ และแบบที่ 3 สีแดงปนดำและสีแดง เมื่อทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยมีสมมติฐาน คือ อัตราส่วนของฟีโนไทป์เยื่อหุ้มเมล็ดมีสี: ไม่มีสี เท่ากับ 1: 1 พบว่า การกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ด ($\chi^2 = 0.032$, p-value = 0.857) เป็นไปตามสมมติฐาน ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล โดยพบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีจะต้องมีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) อย่างน้อย 1 อัลลีล

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) และ RM15209 (*OsMYB3*) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC₁F₁ ด้วยวิธี ANOVA พบว่า เครื่องหมาย RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มีค่า p-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มีความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 (*OsDFR*) ไม่มีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด

การวิเคราะห์หาระดับและทิศทางความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยวิธี Pearson correlation ในประชากร BC₁F₁ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) มีระดับความสัมพันธ์ปานกลางกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทิศทางเชิงบวก ($r = 0.553$, p-value = 0.000) มีระดับความสัมพันธ์สูงกับปริมาณแอนโทไซยานินในทิศทางเชิงบวก ($r = 0.643$, p-value = 0.000) และมีระดับความสัมพันธ์สูงมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ดในทิศทางเชิงบวก ($r = 0.886$, p-value = 0.000) ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (*OsMYB3*) มีระดับความสัมพันธ์ต่ำกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($r = 0.240$, p-value = 0.000) และปริมาณแอนโทไซยานิน ($r = 0.271$, p-value = 0.000) และมีระดับความสัมพันธ์ต่ำมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ($r = 0.139$, p-value = 0.021) ในทิศทางเชิงบวก แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 (*OsDFR*) ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด

การวิเคราะห์หาระดับและทิศทางความสัมพันธ์ของฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์ปานกลางกับปริมาณแอนโทไซยานินในทิศทางเชิงบวก ($r = 0.467$, $p\text{-value} = 0.000$) และมีความสัมพันธ์สูงมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ดในทิศทางเชิงบวก ($r = 0.813$, $p\text{-value} = 0.000$)

การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร BC₁F₁ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 30.59 และ 5.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำทั้งสองเครื่องหมายดังกล่าวมาวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ พบว่า มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 สูงขึ้น เท่ากับ 32.69 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) กับปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 41.29 และ 7.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มาวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ พบว่า มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 สูงขึ้น เท่ากับ 44.69 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฟีโนไทป์ในประชากร F₂ และ BC₁F₁ พบว่า เครื่องหมาย RM17321 (*OsB1&B2*) มีค่า R^2 มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในประชากร F₂ และ BC₁F₁ แสดงว่า เป็นเครื่องหมายหลัก และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (*OsMYB3*) มีค่า R^2 น้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า เป็นเครื่องหมายรอง เมื่อวิเคราะห์เครื่องหมายดังกล่าวร่วมกัน ค่า R^2 มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในประชากร F₂ และ BC₁F₁ แสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของฟีโนไทป์ในประชากร BC₁F₁ พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความสัมพันธ์กับแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*) สามารถใช้ในการคัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีได้ ซึ่งคาดว่าจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานินสูง และเมื่อใช้เครื่องหมาย RM17321 (*OsB1&B2*) ซึ่งเป็นเครื่องหมายหลัก ร่วมกับ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (*OsMYB3*) ซึ่งเป็นเครื่องหมายรอง จะสามารถช่วยคัดเลือกข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานินได้แม่นยำมากยิ่งขึ้น

เมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) และ RM15209 (*OsMYB3*) มาคัดเลือกต้นจากประชากร BC₁F₁ ที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ heterozygous (KP) ของทุกเครื่องหมาย และทดสอบด้วยเครื่องหมายขนานอีกด้านหนึ่งของยีน คือ RM2441 (*OsB1&B2*), RM7419 (*OsDFR*) และ RM15217 (*OsMYB3*) พบว่า สามารถคัดเลือกต้นจากประชากร BC₁F₁ ได้ทั้งหมดจำนวน 15 ต้น และสามารถผลิตเมล็ด BC₂F₁ จาก 15 คู่ผสม สำหรับนำไปปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงโดยวิธีผสมกลับต่อไปได้



บรรณานุกรม

- กรมการข้าว. 2562. **พันธุ์ข้าวและคุณค่าทางโภชนาการ**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.thairicedb.com/rice.php?cid=6> (25 มิถุนายน 2562).
- กรมการข้าว. 2564. **ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://drive.google.com/file/d/1PJeA62qh54lR5FPYI-hVBcNE06PORH9z/view> (25 มิถุนายน 2564).
- กระทรวงพาณิชย์ กองมาตรฐานสินค้านำเข้าส่งออก. 2562. **มาตรฐานสินค้าข้าวสาลีไทย**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.dft.go.th/th-th/Detail-Law/ArticleId/12882/-2562-1-2-3-4-5-6-7-8> (25 มิถุนายน 2562).
- เดชรัตน์ สุขกำเนิด. 2560. **ข้าวชนิดใดมีสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.thairicedb.com/productintro-detail.php?id=9> (25 มิถุนายน 2562).
- บุญหงษ์ จงคิด. 2557. **ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต**. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม. 2561. **วิทยาการข้าวไทย**. ศูนย์บริหารงานวิจัย คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ประพาส วีระแพทย์. 2562. **ข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.saranukromthai.or.th/sub/other_sub.php?file=encyclopedia/book3.html (25 มิถุนายน 2562).
- รัชนี้ คงคาอุยฉาย และริฎุ เจริญศิริ. 2553. คุณค่าทางโภชนาการของข้าวพันธุ์พื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดิน อำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร. **วารสารโภชนาการ**, 45(2), 14-32.
- รัชนี้ คงคาอุยฉาย, ริฎุ เจริญศิริ, อภิชาติ วรรณวิจิตร, และศิริพัฒน์ เรืองพยัค. 2557. **อนุมูลอิสระ**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://dna.kps.ku.ac.th/index.php/article-rice-rsc-rgdu/36-free-radicle-antioxidant-anthrocyanidin> (25 มิถุนายน 2562).
- วิภพ สุทนะ. 2556.ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์ กลไกการออกฤทธิ์. **ศรีนครินทร์เวชสาร**, 28, 567-582.
- วรวิทย์ พาณิชพัฒน์. 2563. **ข้าว: ผลงานที่ถึงมือชาวนา (Rice: The Result of Works Render to Farmers)**. กรุงเทพฯ โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- วราภรณ์ แสงทอง. 2561. **ยีนหอมของข้าว และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก**. มหาวิทยาลัยแม่โจ้: สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ.

- นิพนธ์ ลิ้มสงวน และประมวล ทราญทอง. 2018. สมบัติเชิงหน้าที่ของข้าวไทย: การต้านอนุมูลอิสระ และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สุขภาพ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 26(8), 1336-1347.
- สงกรานต์, จิตรากร. 2527. "ความสำคัญและวิวัฒนาการของข้าว". ใน **เอกสารประกอบการบรรยายฝึกอบรมเรื่องการรวบรวมพันธุ์ข้าว**. กรุงเทพฯ.
- _____. 2532. "ทรัพยากรเชื้อพันธุ์ข้าวป่าในประเทศไทย". ใน **เอกสารประกอบการบรรยายในการสัมมนาวิชาการเรื่องแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมพืช**.
- สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2553. แอนโทไซยานิน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://siweb.dss.go.th/repack/fulltext/IR21.pdf> (25 มิถุนายน 2562).
- สุดยอดข้าวไทย. 2562. **พันธุ์ข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.toyota.co.th/rrc/download/The%20Rice%20Book02_optimize1-1.pdf (25 มิถุนายน 2562).
- สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2553. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 3: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์. **วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 5(2), 37-59.
- อนงค์นาฏ หรีจันดา, แสงทอง พงษ์เจริญกิต, วราภรณ์ แสงทอง และ ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์. 2562. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* สำหรับใช้ตรวจสอบข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ของกลุ่มสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและม่วง. น.181-189. ใน **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 21**. โรงแรมเดอะชาयน์ พัทยา ชลบุรี.
- อนงค์นาฏ หรีจันดา. 2564. **การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและมีแอนโทไซยานินสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- อนงค์นาฏ หรีจันดา, วราภรณ์ แสงทอง, แสงทอง พงษ์เจริญกิต, นฤมล เข้มกลัดเงิน, สมจริง รุ่งแจ้ง, กฤษณะ ลานน้ำเที่ยง และช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์. 2564. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากรชั่วที่ 2 ของกลุ่มสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 กับก้าน้อย. **วารสารแก่นเกษตร**.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. 2560. **ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Agrawal, A. 2021. Black Rice the New black gold of India. **Food and Agriculture Spectrum Journal**, 2(01), 96-99.
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R., Bagchi, M., Bagchi, D., Balmoori, J. & Stohs, S. 1998. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. **General Pharmacology: The Vascular System**, 30(5), 771-776.
- Bardenas, E. A. 1965. **Morphology and Varietal Characteristics of the Rice Plant**, The. Int. Rice Res. Inst.
- Basunanda, P. & Murti, R. H. 2019. Inheritance of pericarp pigment on crossing between black rice and white rice. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, 41(2), 383-388.
- Bounphanousay, C., Jaisil, P., McNally, K., Sanitchon, J. & Sackville Hamilton, N. 2008. Variation of microsatellite markers in a collection of Lao's black glutinous rice (*Oryza sativa* L.). **Asian Journal of Plant Sciences**, 7(2), 140-148.
- Brown, S. M., Szewc-McFadden, A. & Kresovich, S. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. **Methods of genome analysis in plants**, 1, 147-158.
- Chen, M.-H., McClung, A. M. & Bergman, C. J. 2016. Concentrations of oligomers and polymers of proanthocyanidins in red and purple rice bran and their relationships to total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity and whole grain color. **Food Chemistry**, 208, 279-287.
- Chin, H. S., Wu, Y. P., Hour, A. L., Hong, C. Y. & Lin, Y. R. 2016. Genetic and evolutionary analysis of purple leaf sheath in rice. **Rice**, 9(1), 8.
- Choudhury, B. I., Khan, M. L. & Dayanandan, S. 2014. Patterns of nucleotide diversity and phenotypes of two domestication related genes (*OsC1* and *Wx*) in indigenous rice varieties in Northeast India. **BMC genetics**, 15(1), 71.
- Collard, B. C. & Mackill, D. J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 363(1491), 557-572.
- Cossins, E., Lee, R. & Packer, L. 1998. ESR studies of vitamin C regeneration, order of

- reactivity of natural source phytochemical preparations. **IUBMB Life**, 45(3), 583-597.
- Das, A. B., Goud, V. V. & Das, C. 2020. Degradation kinetics of anthocyanins from purple rice bran and effect of hydrocolloids on its stability. **Journal of Food Process Engineering**, 43(4), e13360.
- Eizenga, G., Sanchez, P., Jackson, A., Edwards, J., Hurwitz, B. L., Wing, R. A. & Kudrna, D. 2017. Genetic variation for domestication-related traits revealed in a cultivated rice, Nipponbare (*Oryza sativa* ssp. japonica) × ancestral rice, *O. nivara*, mapping population. **Molecular breeding**, 37(11), 135.
- Finocchiaro, F., Ferrari, B. & Gianinetti, A. 2010. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. **Journal of Cereal Science**, 51(1), 28-34.
- Furukawa, T., Maekawa, M., Oki, T., Suda, I., Iida, S., Shimada, H., Takamure, I. & Kadowaki, K. i. 2007. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. **The Plant Journal**, 49(1), 91-102.
- Gramene. **Supplementary Table 18**. 2021. [Online]. Available <https://archive.gramene.org/markers/microsat/>.
- Geekiyanaige, H., Jicha, G. A., Nelson, P. T. & Chan, C. 2012. Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. **Experimental neurology**, 235(2), 491-496.
- Hosoda, K., Sasahara, H., Matsushita, K., Tamura, Y., Miyaji, M. & Matsuyama, H. 2018. Anthocyanin and proanthocyanidin contents, antioxidant activity, and in situ degradability of black and red rice grains. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 31(8), 1213.
- Hu, J., Anderson, B. & Wessler, S. R. 1996. Isolation and characterization of rice *R* genes: evidence for distinct evolutionary paths in rice and maize. **Genetics**, 142(3), 1021-1031.
- Hu, W., Zhou, T., Han, Z., Tan, C. & Xing, Y. 2020. Dominant complementary interaction between *OsC1* and two tightly linked genes, *Rb1* and *Rb2*, controls the purple leaf sheath in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, 133, 2555-

2566.

- Huang, Y. P. & Lai, H. M. 2016. Bioactive compounds and antioxidative activity of colored rice bran. **Journal of Food and Drug Analysis**, 24(3), 564-574.
- Hwang, S. K. & Kim, Y. M. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. **Journal of biochemistry and molecular biology**, 33(6), 537-540.
- Ichikawa, H., Ichiyanagi, T., Xu, B., Yoshii, Y., Nakajima, M. & Konishi, T. 2001. Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. **Journal of medicinal food**, 4(4), 211-218.
- Inta, P., Phongburaphat, W., Pongjaroenkit, S., Chowpongpan, S., Sangtong, V. & Sakulsingharoj, C. 2013. Cloning and characterization of *OSB2* gene controlling anthocyanin biosynthesis in rice. **Thai J Genet**, 6, 25-29.
- Jamjod, S., Yimyam, N., Lordkaew, S., Prom-u-thai, C. & Rerkasem, B. 2017. Characterization of on-farm rice germplasm in an area of the crop's center of diversity. **Chiang Mai Univ J Nat Sci**, 16, 85-98.
- Jiamyangyuen, S., Nuengchamnong, N. & Ngamdee, P. 2017. Bioactivity and chemical components of Thai rice in five stages of grain development. **Journal of cereal science**, 74, 136-144.
- Kochert, G. 1994. RFLP technology. DNA-based markers in plants. **Kluwer Academic Publishers, Dordrecht**, 8-38.
- Kong, L., Wang, Y. & Cao, Y. 2008. Determination of Myo-inositol and D-chiro-inositol in black rice bran by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21(6), 501-504.
- Kristamtini, K., Taryono, T., Basunanda, P. & Murti, R. H. 2018. Use of microsatellite markers to detect heterozygosity in an F_2 generation of a black rice and white rice cross. **Indonesian Journal of Biotechnology**, 23(1), 28-34.
- Kumar, D., Das, P. K., Singha, C. & Sarmah, B. K. 2020. Mining and Characterizing the SSR Markers for Black Rice Using the Illumina Sequencing Platform.
- Kushwaha, U. K. S. 2016. **Black rice**. In Black Rice (pp. 21-47): Springer.
- Lee, K. E., Rahman, M. M., Kim, J. B. & Kang, S. G. 2018. Genetic Analysis of Complementary Gene Interactions of *Pb* and *Pp* Genes for the Purple Pericarp

- Trait in Rice. **Journal of Life Science**, 28(4), 398-407.
- Lim, S. H. & Ha, S. H. 2013. Marker development for the identification of rice seed color. **Plant biotechnology reports**, 7(3), 391-398.
- Maeda, H., Yamaguchi, T., Omoteno, M., Takarada, T., Fujita, K., Murata, K., Iyama, Y., Kojima, Y., Morikawa, M. & Ozaki, H. 2014. Genetic dissection of black grain rice by the development of a near isogenic line. **Breeding science**, 64(2), 134-141.
- Mapan, P., Suphannika, T., Prom-u-thai, C., Kaladee, D. & Jamjod, S. 2014. Early generation selection for high anthocyanin and photoperiod insensitivity in F₂ population between Kumdoisaket and Pathumthani 1. **Naresuan Phayao Journal**, 7, 160-171.
- Martin, C. & Paz-Ares, J. 1997. MYB transcription factors in plants. **Trends in Genetics**, 13(2), 67-73.
- Mbanjo, E. G. N., Kretzschmar, T., Jones, H., Ereful, N., Blanchard, C., Boyd, L. A. & Sreenivasulu, N. 2020. The genetic basis and nutritional benefits of pigmented rice grain. **Frontiers in genetics**, 11, 229.
- McCouch, S. & Tanksley, S. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. **Rice biotechnology**, 6.
- Min, B., Gu, L., McClung, A. M., Bergman, C. J. & Chen, M.-H. 2012. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. **Food Chemistry**, 133(3), 715-722.
- Muntana, N. & Prasong, S. 2010. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, 13(4), 170-174.
- Nagao, S. & Takahashi, M. E. 1963. Trial Construction of Twelve Linkage Groups in Japanese Rice: (Genetical Studies on Rice Plant, **XXVII**). **Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University**, 53(1), 72-130.
- Nakai, K., Inagaki, Y., Nagata, H., MIYKZAKI, C. & IIDA, S. 1998. Molecular characterization of the gene for dihydroflavonol 4-reductase of japonica rice varieties. **Plant Biotechnology**, 15(4), 221-225.

- Oikawa, T., Maeda, H., Oguchi, T., Yamaguchi, T., Tanabe, N., Ebana, K., Yano, M., Ebitani, T. & Izawa, T. 2015. The birth of a black rice gene and its local spread by introgression. **The Plant Cell**, 27(9), 2401-2414.
- Peng, C., Lin, Z., Lin, G. & Chen, S. 2006. The anti-photooxidation of anthocyanins-rich leaves of a purple rice cultivar. **Science in China Series C: Life Sciences**, 49(6), 543-551.
- Powell, W., Machray, G. C. & Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, 1(7), 215-222.
- Priyadarshini, M., Kumar, P. & Sharma, V. 2018. Molecular differentiation and classification in relation to fragrance of landraces and improved varieties of aromatic rice using microsatellite markers. **Int J Chem Stud**, 6(3014-3021).
- Pusadee, T., Wongtamee, A., Rerkasem, B., Olsen, K. M. & Jamjod, S. 2019. Farmers Drive Genetic Diversity of Thai Purple Rice (*Oryza sativa* L.) Landraces. **Economic Botany**, 1-10.
- Rachasima, L. N., Sukkasem, R., Pongjaroenkit, S., Sangtong, V., Chowpongpan, S. & Sakulsingharoj, C. 2017. Expression analysis and nucleotide variation of *OsC1* gene associated with anthocyanin pigmentation in rice. **Genomics and Genetics**, 10(3), 46-53.
- Rachasima, L. N., Richinda, A., Pongjaroenkit, S., Sangtong V., & Sakulsingharoj, C. 2019. Application of DNA Marker of *OsC1* Gene for Identification of Pericarp Color in Thai Rice. **The 21st National Genetics Conference (NGC2019)**. Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand.
- Rahman, M. M., Lee, K. E. & Kang, S. G. 2016. Allelic gene interaction and anthocyanin biosynthesis of purple pericarp trait for yield improvement in black rice. **Journal of Life Science**, 26(6), 727-736.
- Rahman, M. M., Lee, K. E., Lee, E. S., Matin, M. N., Lee, D. S., Yun, J. S., Kim, J. B. & Kang, S. G. 2013. The genetic constitutions of complementary genes Pp and Pb determine the purple color variation in pericarps with cyanidin-3-O-glucoside depositions in black rice. **Journal of plant biology**, 56(1), 24-31.
- Reddy, V., Dash, S. & Reddy, A. 1995. Anthocyanin pathway in rice (*Oryza sativa* L): identification of a mutant showing dominant inhibition of anthocyanins in leaf

- and accumulation of proanthocyanidins in pericarp. **Theoretical and Applied Genetics**, 91(2), 301-312.
- Ricebase. 2564. **Markers**. [Online]. Available <https://ricebase.org/search/markers> (28 July 2564).
- Roy, S. C. & Shil, P. 2020. Black Rice Developed Through Interspecific Hybridization (*O. sativa* x *O. rufipogon*): Origin of Black Rice Gene from Indian Wild Rice. **bioRxiv**.
- Rysbekova, A., Kazkeyev, D., Usenbekov, B., Mukhina, Z. M., Zhanbyrbaev, E., Sartbaeva, I., Zhambakin, K. Z., Berkimbay, K. A. & Batayeva, D. 2017. Prebreeding selection of rice with colored pericarp based on genotyping *Rc* and *Pb* genes. **Russian Journal of Genetics**, 53(1), 49-58.
- Saitoh, K., Onishi, K., Mikami, I., Thidar, K. & Sano, Y. 2004. Allelic diversification at the C (*OsC1*) locus of wild and cultivated rice: nucleotide changes associated with phenotypes. **Genetics**, 168(2), 997-1007.
- Sakamoto, W., Ohmori, T., Kageyama, K., Miyazaki, C., Saito, A., Murata, M., Noda, K. & Maekawa, M. 2001. The Purple leaf (PL) locus of rice: the PL w allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. **Plant and cell physiology**, 42(9), 982-991.
- Sakulsingharoj, C., Inta, P., Sukkasem, R., Pongjaroenkit, S., Chowpongpan, S. & Sangtong, V. 2014. Overexpression of *OsB2* gene in transgenic rice up-regulated expression of structural genes in anthocyanin biosynthesis pathway. **Genomics and Genetics**, 7(3), 173-182.
- _____. 2016. Cloning and characterization of *OsB1* gene controlling anthocyanin biosynthesis from Thai black rice. **Genomics and Genetics**, 9(1), 7-18.
- Sari, D. R. T., Paemanee, A., Roytrakul, S., Cairns, J. R. K., Safitri, A. & Fatchiyah, F. 2021. Black rice cultivar from Java Island of Indonesia revealed genomic, proteomic, and anthocyanin nutritional value. **Acta Biochimica Polonica**, 68(1), 55-63.
- Shao, Y., Jin, L., Zhang, G., Lu, Y., Shen, Y. & Bao, J. 2011. Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. **Theoretical and applied genetics**, 122(5), 1005-1016.
- Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J. & Beta, T. 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.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E. & Kakuda, Y. 2003. Polyphenolics in grape seeds—biochemistry and functionality. **Journal of medicinal food**, 6(4), 291-299.
- Shih, C. H., Chu, H., Tang, L. K., Sakamoto, W., Maekawa, M., Chu, I. K., Wang, M. & Lo, C. 2008. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. **Planta**, 228(6), 1043-1054.
- Shin, Y. M., Park, H. J., Yim, S. D., Baek, N. I., Lee, C. H., An, G. & Woo, Y. M. 2006. Transgenic rice lines expressing maize C1 and R-S regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. **Plant biotechnology journal**, 4(3), 303-315.
- Smulders, M., Bredemeijer, G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P. & Vosman, B. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. **Theoretical and Applied Genetics**, 94(2), 264-272.
- Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G. & Berghofer, E. 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. & Sudarat, J. 2012. Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice. **International Food Research Journal**, 19(1).
- Sweeney, M. T., Thomson, M. J., Pfeil, B. E. & McCouch, S. 2006. Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **The Plant Cell**, 18(2), 283-294.
- Tanksley, S., Young, N., Paterson, A. & Bonierbale, M. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/technology**, 7(3), 257.
- Tarang, A., Kordrostami, M., Kumleh, A. S., Chaleshtori, M. H., Saravani, A. F., Ghanbarzadeh, M. & Sattari, M. 2020. Study of genetic diversity in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars of Central and Western Asia using microsatellite markers tightly linked to important quality and yield related traits. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 67(6), 1537-1550.

- Vichit, W. & Saewan, N. 2015. Antioxidant activities and cytotoxicity of Thai pigmented rice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 7(7), 329-334.
- Vilayheuang, K., Machida-Hirano, R., Bounphanousay, C. & Watanabe, K. N. 2016. Genetic diversity and population structure of 'Khao Kai Noi', a Lao rice (*Oryza sativa* L.) landrace, revealed by microsatellite DNA markers. **Breeding science**, 66(2), 204-212.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. v. d., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J. & Kuiper, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, 23(21), 4407-4414.
- Wamaedeesa, R. 2016. **Molecular Aspects of 2OG-Fe (II) - Dioxygenases and Response to Abiotic Stress in Rice**. [Online]. Available http://centaur.reading.ac.uk/68587/1/19022544_Wamaedeesa_thesis.pdf (5 June 2019)
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, 18(22), 6531-6535.
- Xia, D., Zhou, H., Wang, Y., Li, P., Fu, P., Wu, B. & He, Y. 2021. How rice organs are colored: the genetic basis of anthocyanin biosynthesis in rice. **The Crop Journal**, 9(3), 598-608
- Yuliana, N. D. & Akhbar, M. A. 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.
- Zhao, S., Wang, C., Ma, J., Wang, S., Tian, P., Wang, J., Cheng, Z., Zhang, X., Guo, X. & Lei, C. 2016. Map-based cloning and functional analysis of the chromogen gene C in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Biology**, 59(5), 496-505.
- Zheng, J., Wu, H., Zhu, H., Huang, C., Liu, C., Chang, Y., Kong, Z., Zhou, Z., Wang, G. & Lin, Y. 2019. Determining factors, regulation system, and domestication of anthocyanin biosynthesis in rice leaves. **New Phytologist**, 223(2), 705-721.
- Zhou, L. L., Zeng, H. N., Shi, M.-Z. & Xie, D. Y. 2008. Development of tobacco callus cultures over expressing Arabidopsis PAP1/MYB75 transcription factor and

characterization of anthocyanin biosynthesis. **Planta**, 229(1), 37.

Zhu, Q., Yu, S., Zeng, D., Liu, H., Wang, H., Yang, Z., Xie, X., Shen, R., Tan, J. & Li, H.

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.

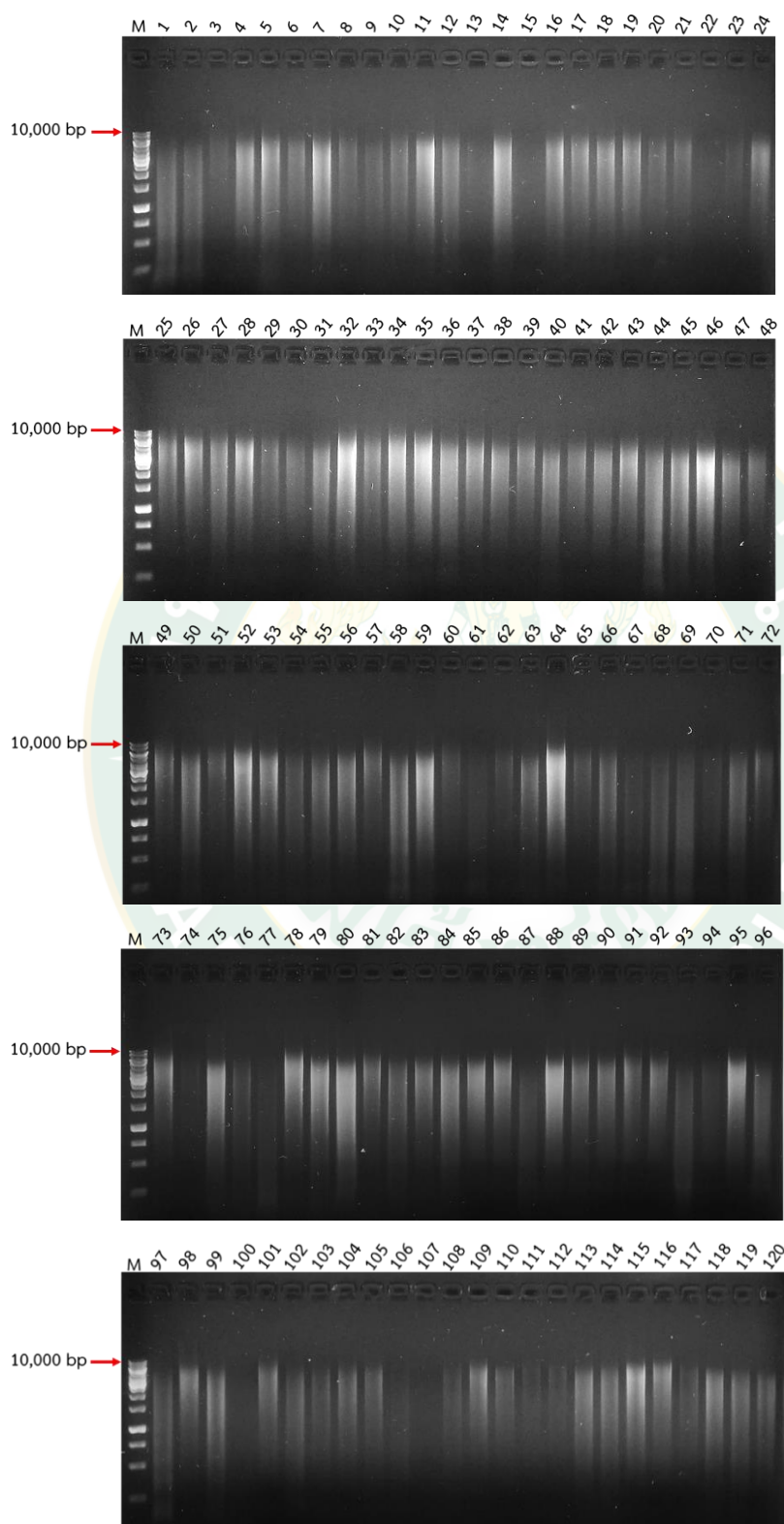


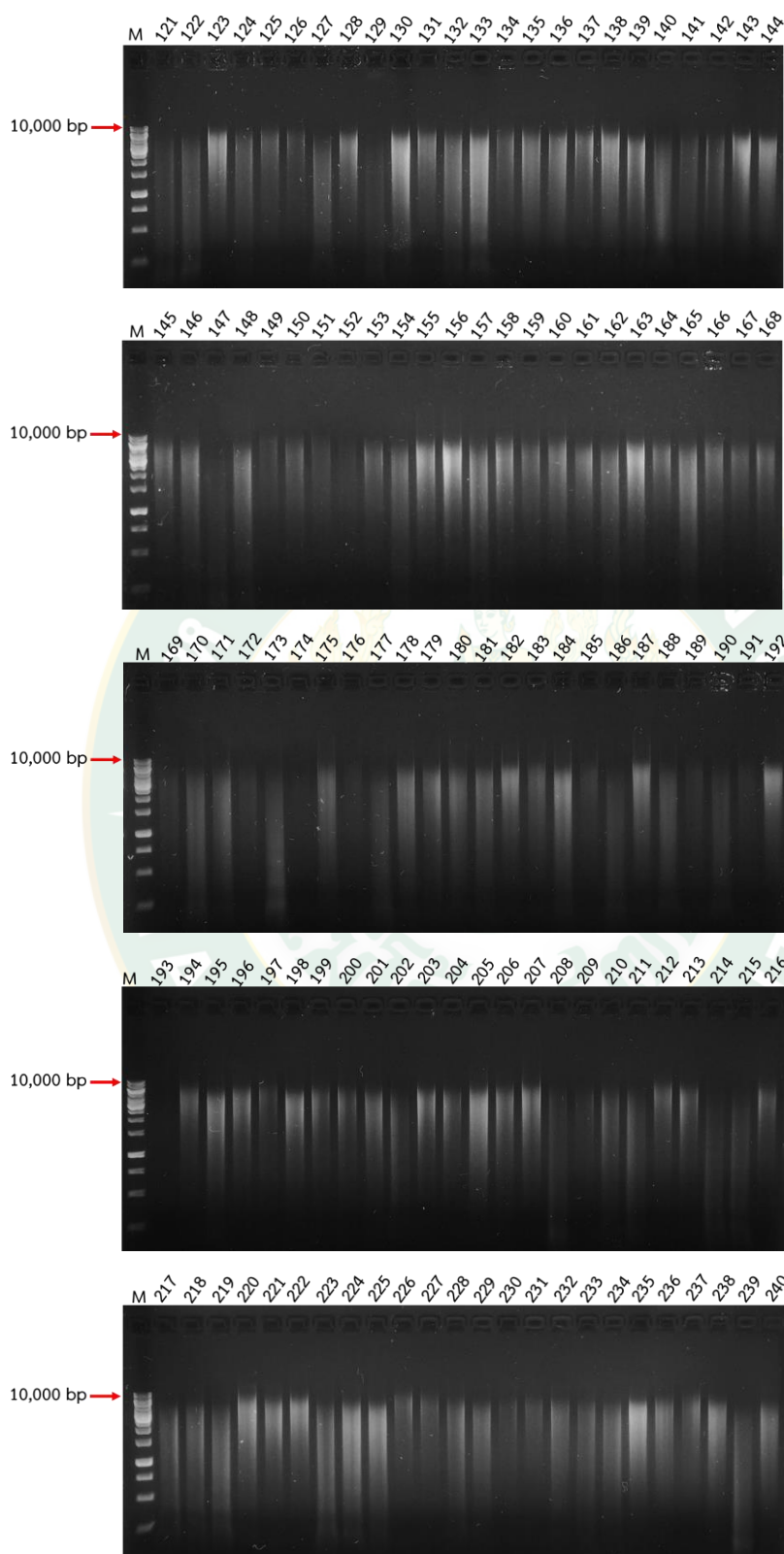


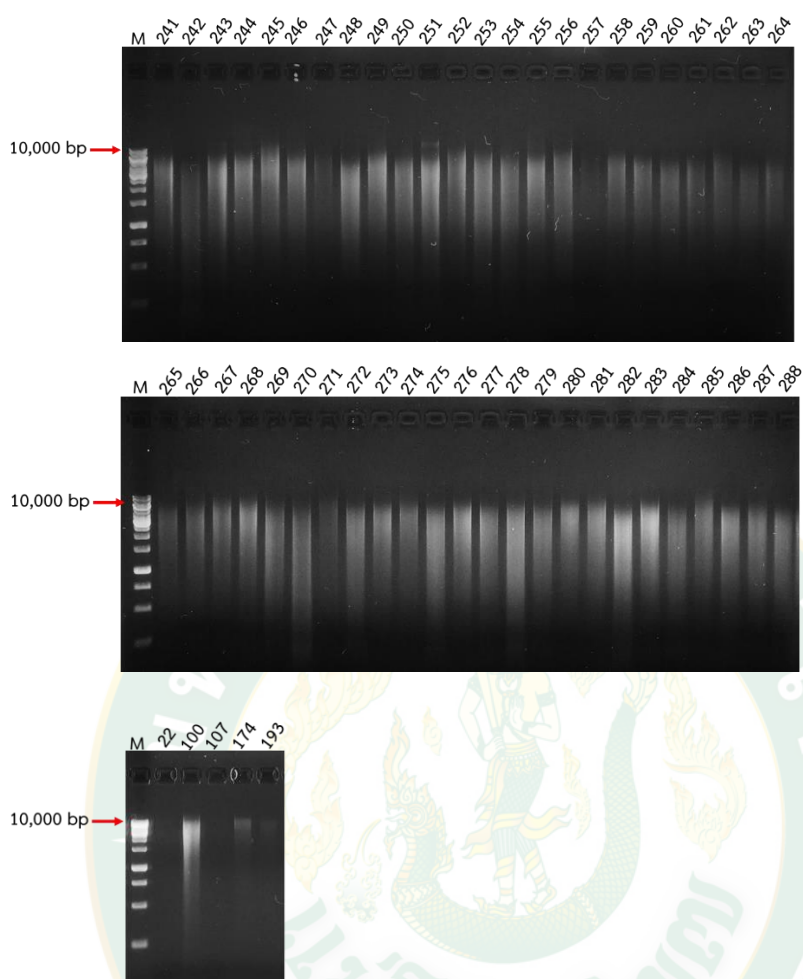


ภาคผนวก ก
การสั้ดดีเ็นเอ

1. การสกัดดีเอ็นเอในประชากร F₂

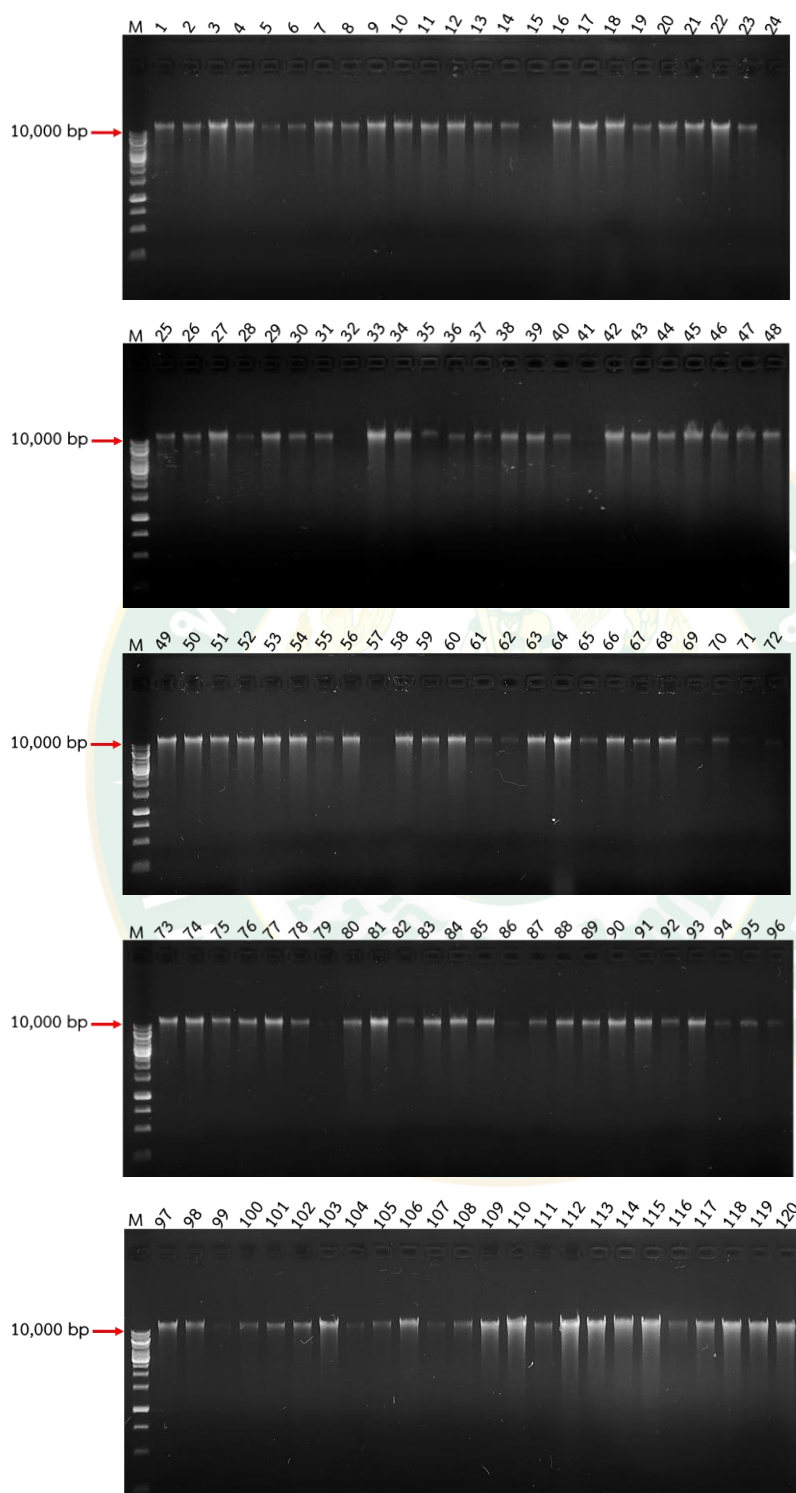


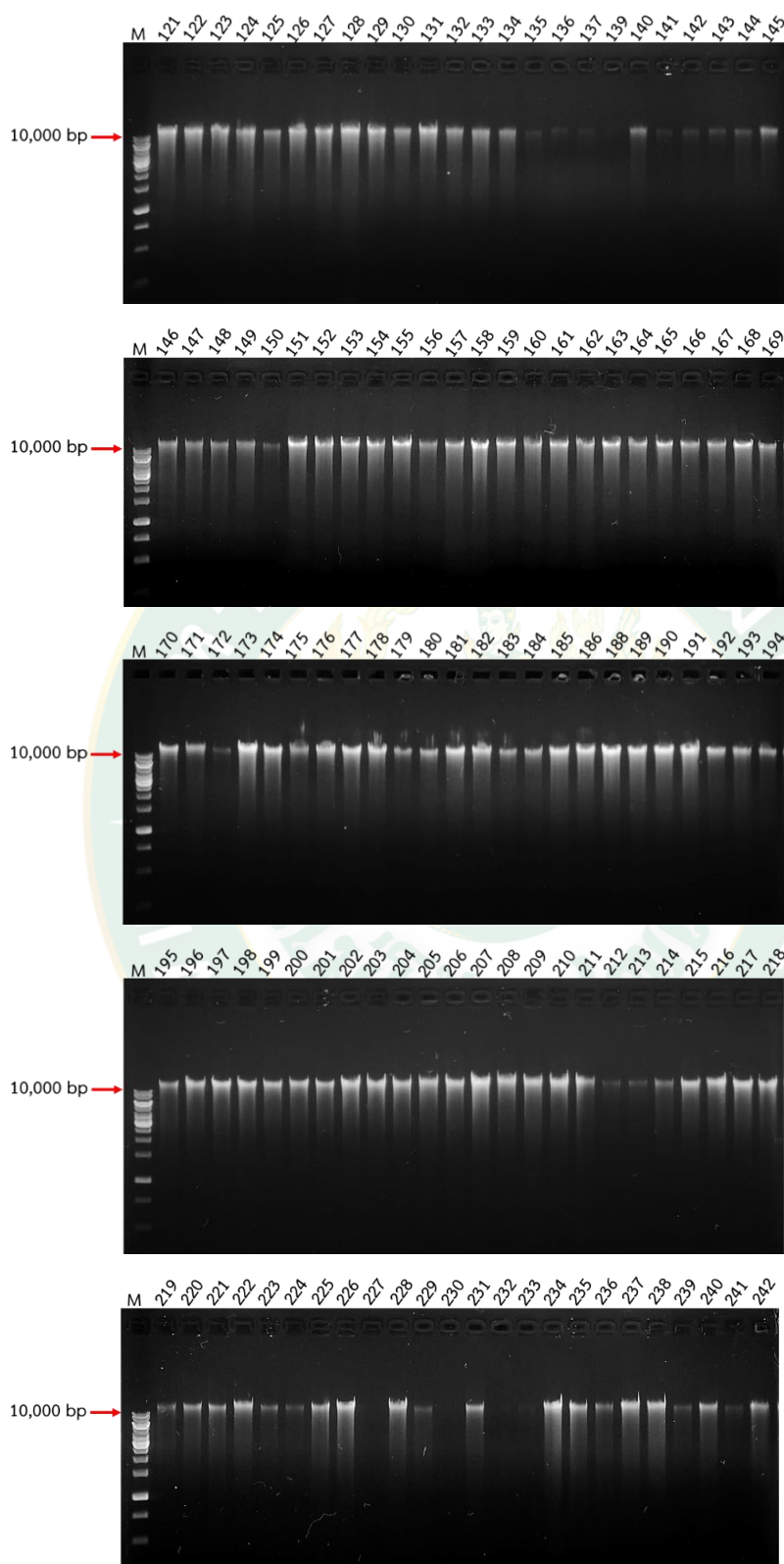


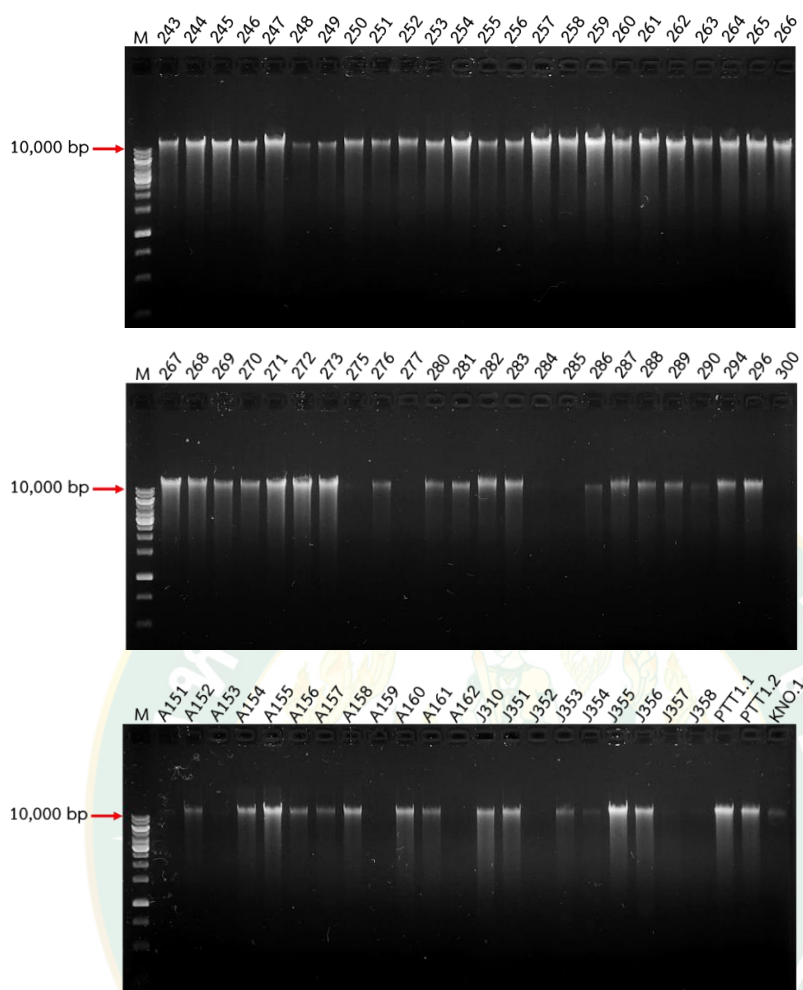


ภาพผนวกที่ 1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 ทั้งหมด 288 ต้น
 ตัวเลข 1 - 288 คือ ต้นที่ 1 - 288 และผลการสกัดดีเอ็นเอซ้ำของต้นที่ 22, 100, 107, 174
 และ 193 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

2. การสกัดดีเอ็นเอในประชากร BC₁F₁

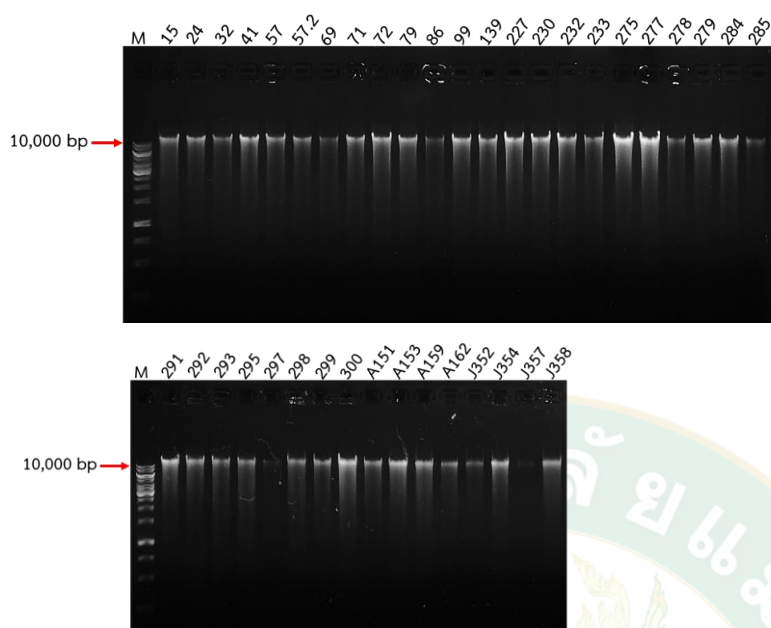






ภาพผนวกที่ 2 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร BC_1F_1 ทั้งหมด 321 ต้น ตัวเลข 1 - 300 คือ ต้นที่ 1 - 300, ต้น A151-A162 คือ ต้นที่ 301-312 ต้น J310 - J358 คือ ต้นที่ 313-321, PTT1.1 และ PTT1.2 คือ ปทุมธานี 1 ข้าวที่ 1 และ 2 และ KNO.1 คือ ก้าน้อย ข้าวที่ 1, M คือ ดีเอ็นเอ

มาตรฐาน 1 kb DNA Ladder



ภาพผนวกที่ 3 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร BC₁F₁ ทั้งหมด จำนวน 38 ต้น ประกอบด้วย 9 ต้น คือ ต้นที่ 278, 279, 291, 292, 293 295, 297, 298 และ 299 ตามลำดับ และ ผลการสกัดดีเอ็นเอซ้ำ จำนวน 29 ต้น คือ ต้นที่ 15, 24, 32, 41, 57, 69, 71, 72, 79, 86, 99, 139, 227, 230, 232, 233, 275, 277, 284, 285, 300, A151, A153, A159, A162, J352, J354, J357 และ J358 ตามลำดับ, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

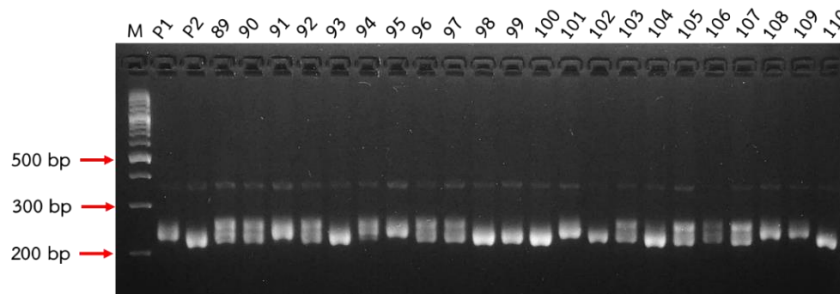
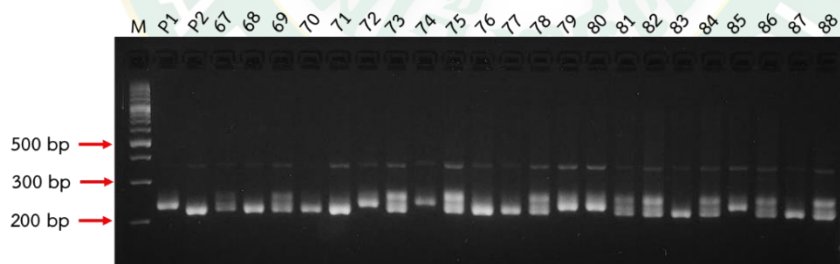
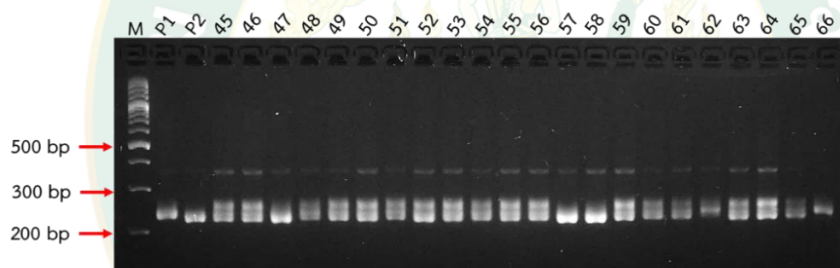
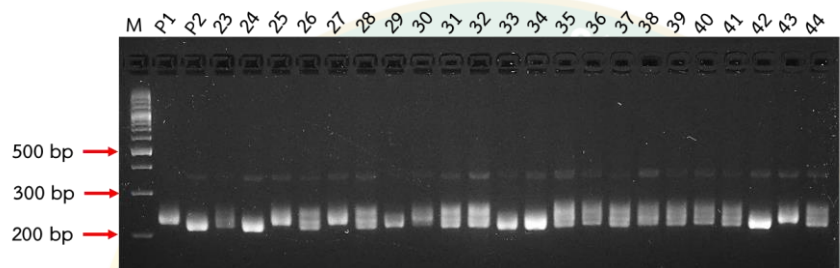
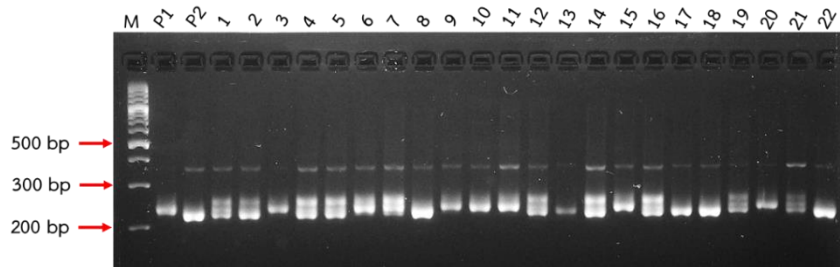


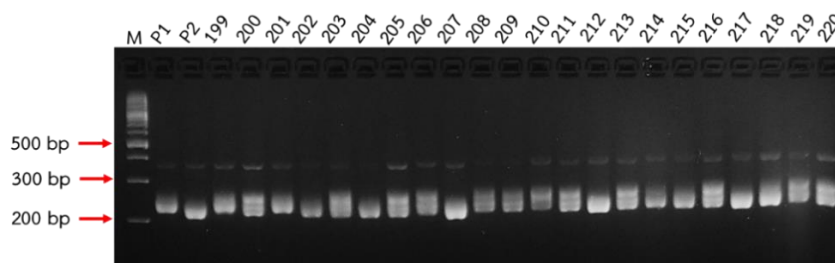
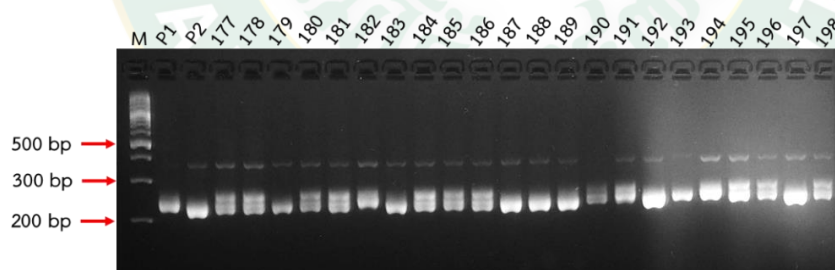
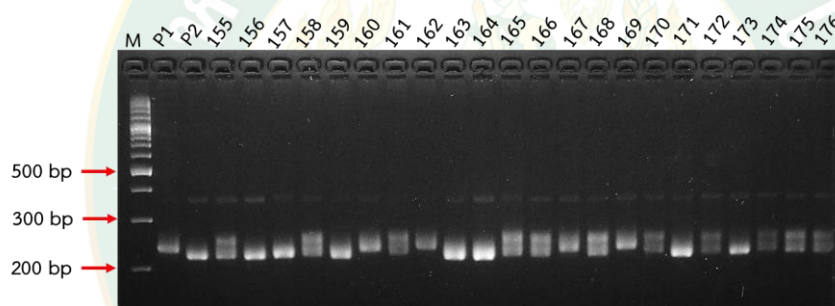
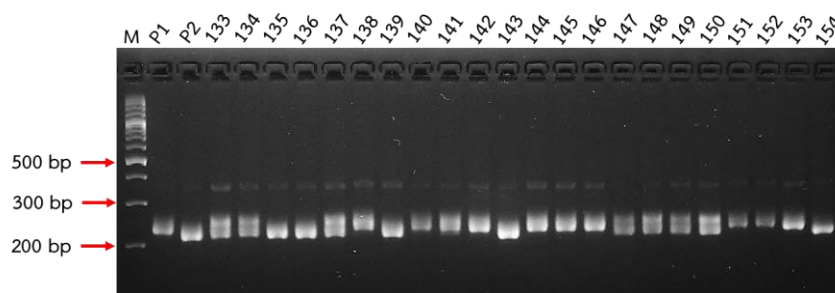
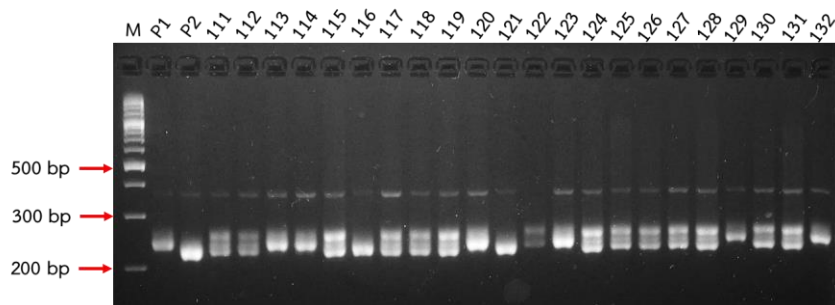
ภาคผนวก ข

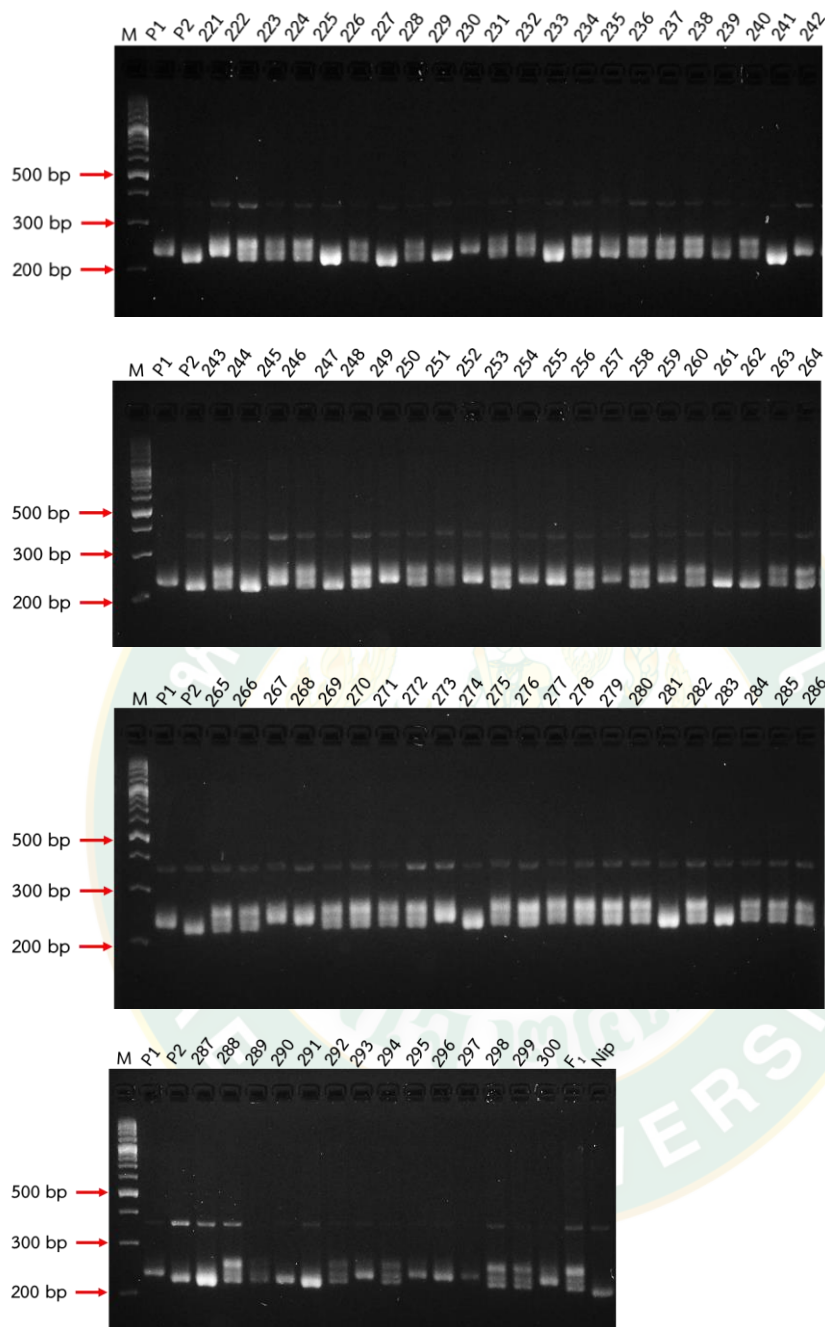
การตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 และ BC_1F_1

1. การตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากร F₂

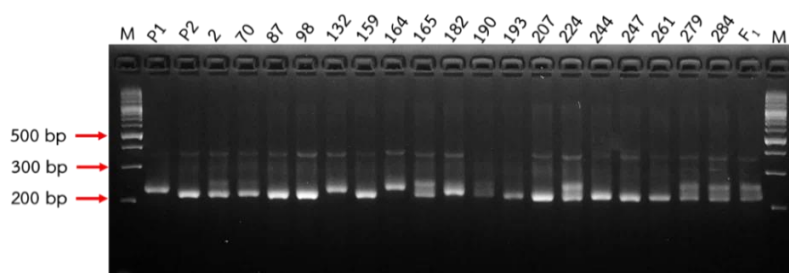
1.1 เครื่องหมาย RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*





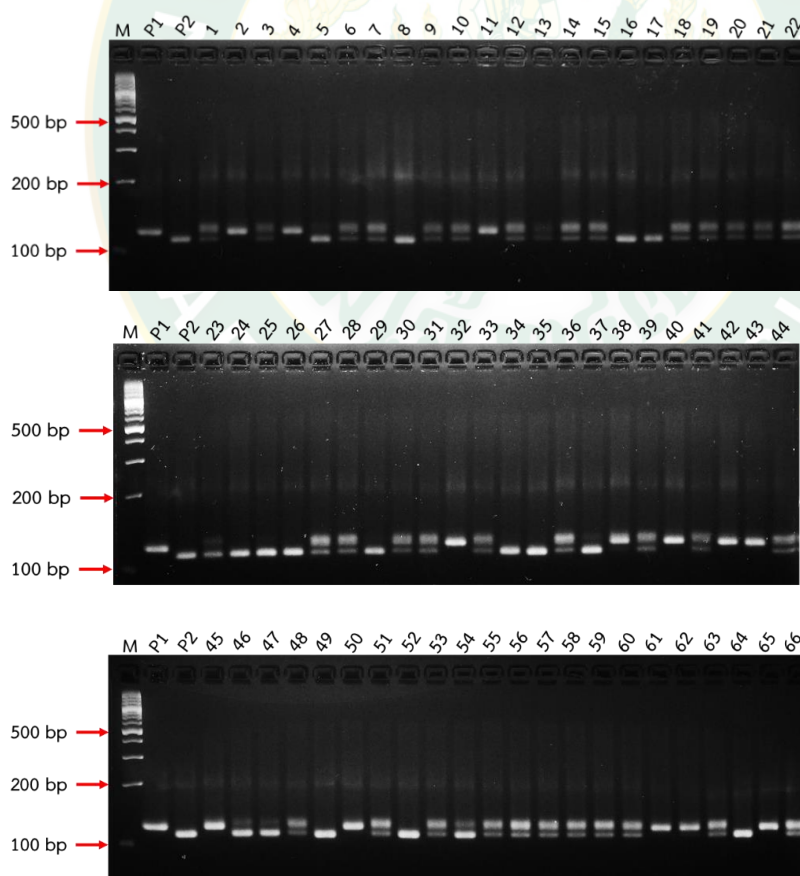


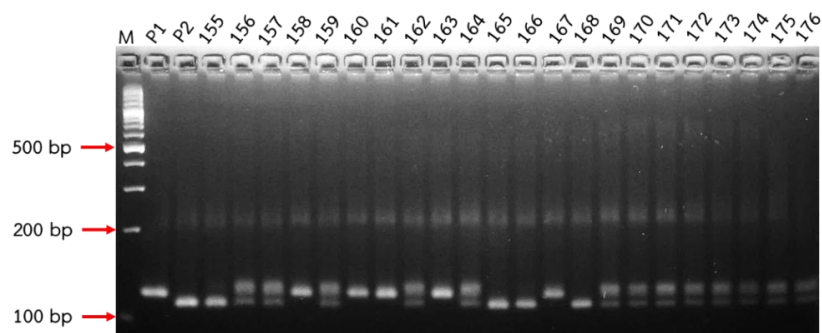
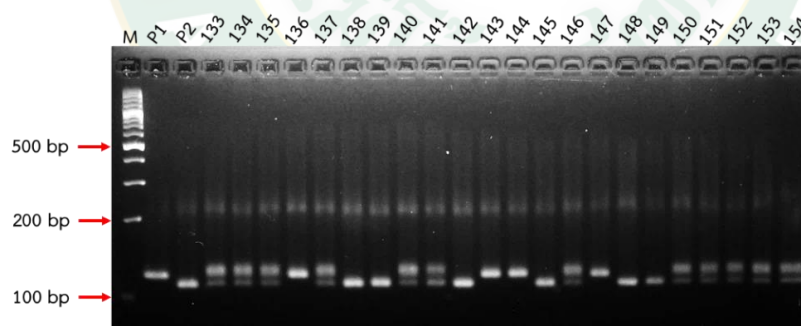
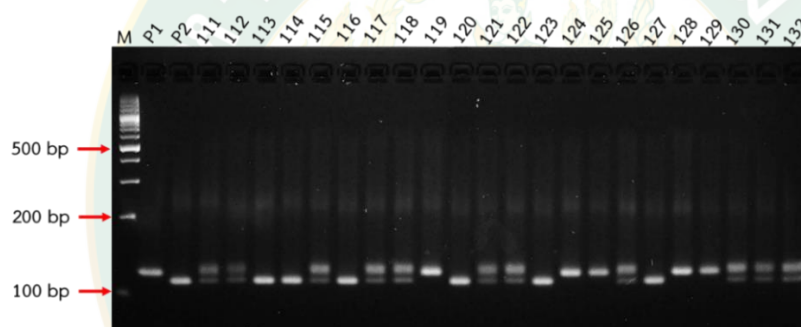
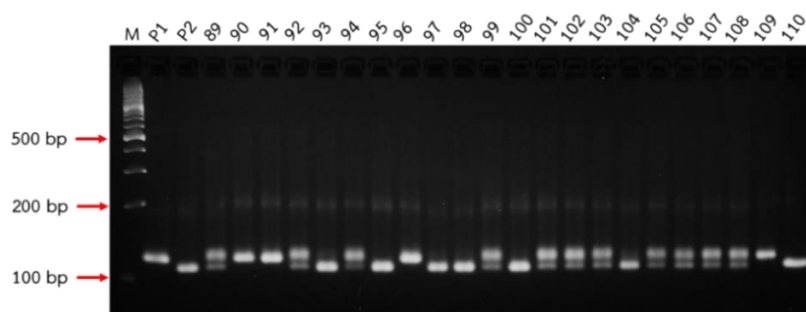
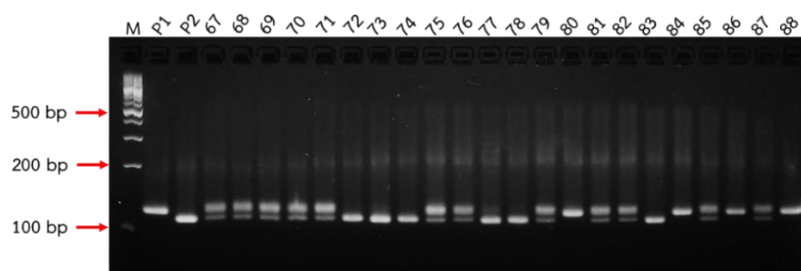
ภาพผนวกที่ 4 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* ในประชากร F_2 ตัวเลข 1-300 คือ ต้นที่ 1-300, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, F_1 คือ ลูกผสมชั่วที่ 1, Nip คือ พันธุ์ Nipponbare M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

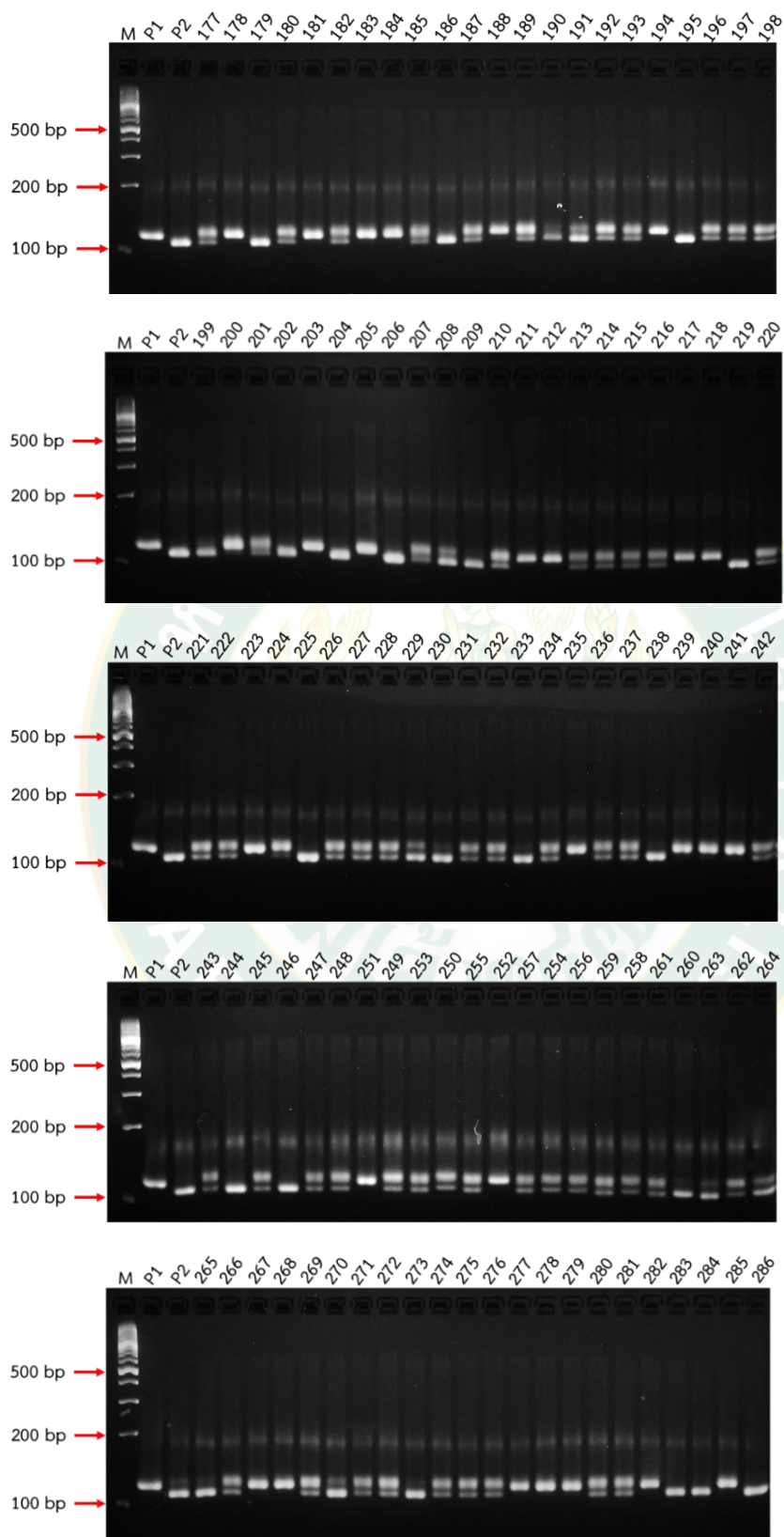


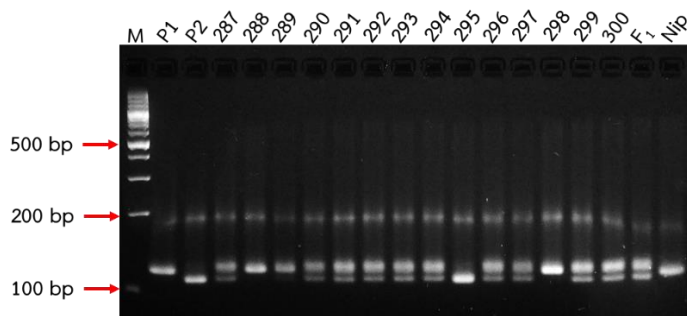
ภาพผนวกที่ 5 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* ครั้งที่ 2 ในประชากร F_2 ต้นที่ 2, 70, 87, 98, 132, 159, 164, 165, 182, 190, 193, 207, 224, 244, 247, 261, 279 และ 284, P1 คือ พันธุ์รับพุ่มธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, F₁ คือ ลูกผสมชั่วที่ 1, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

1.2 เครื่องหมาย RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR*



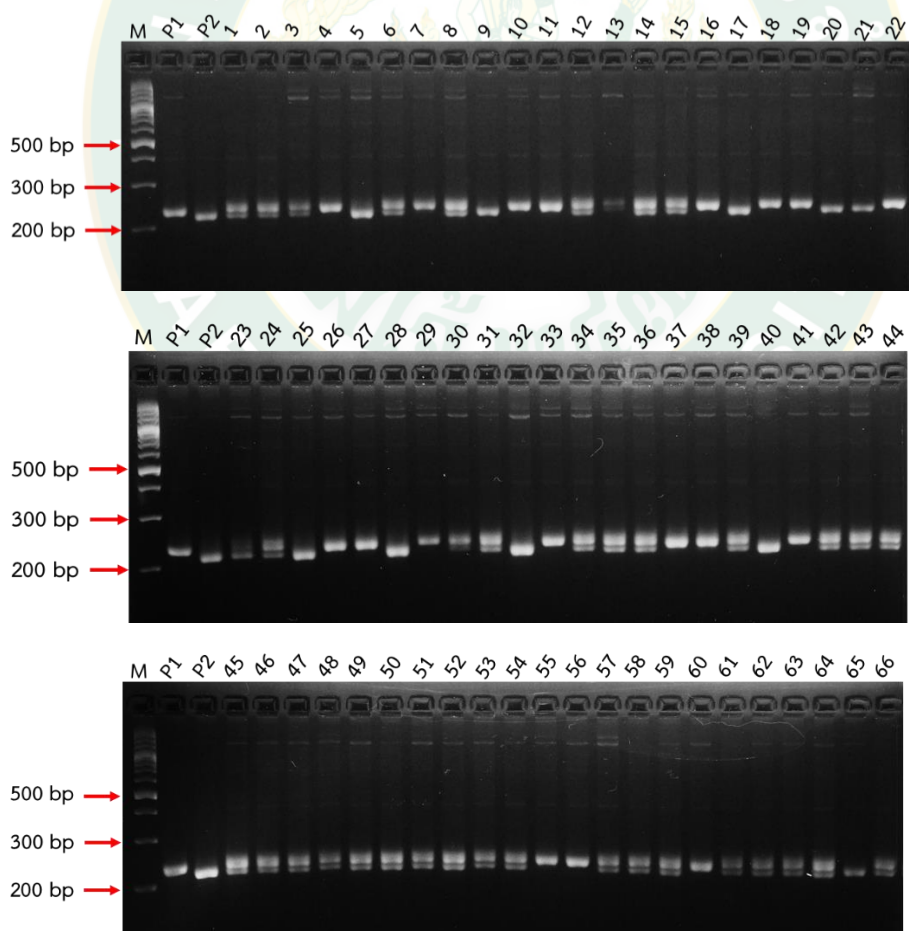


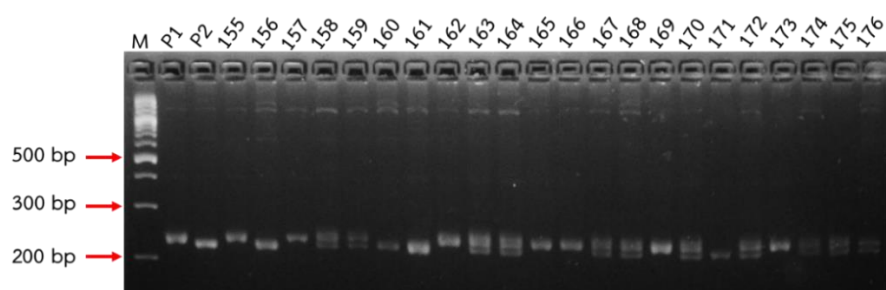
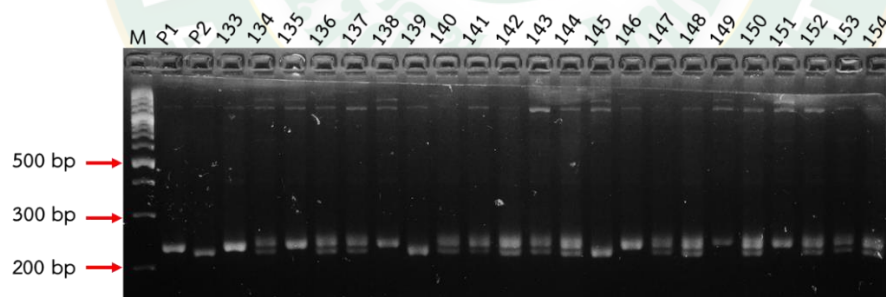
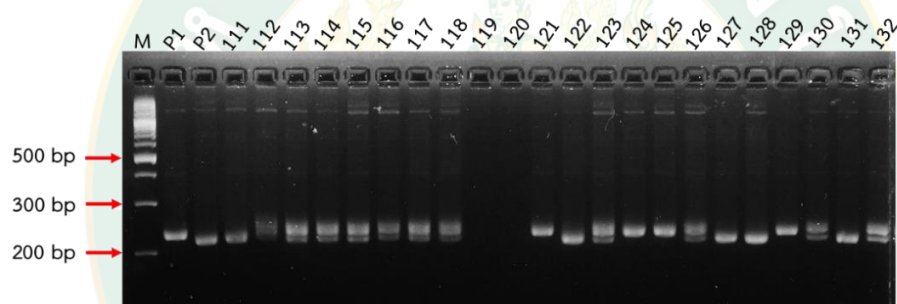
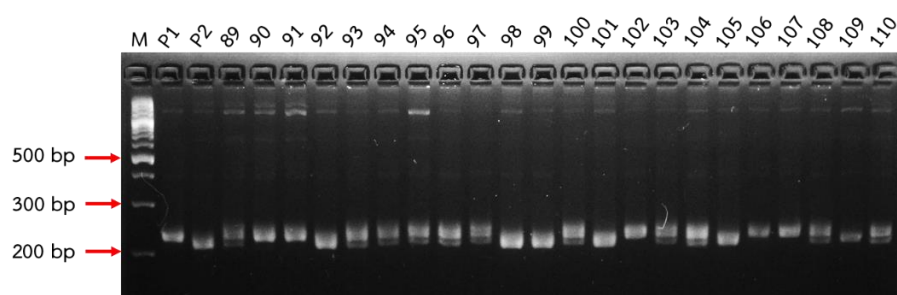
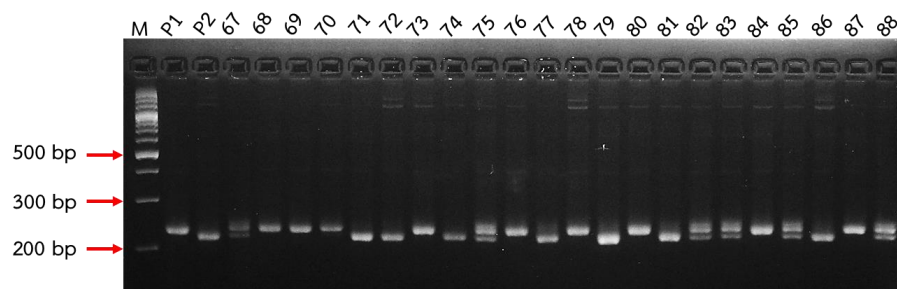


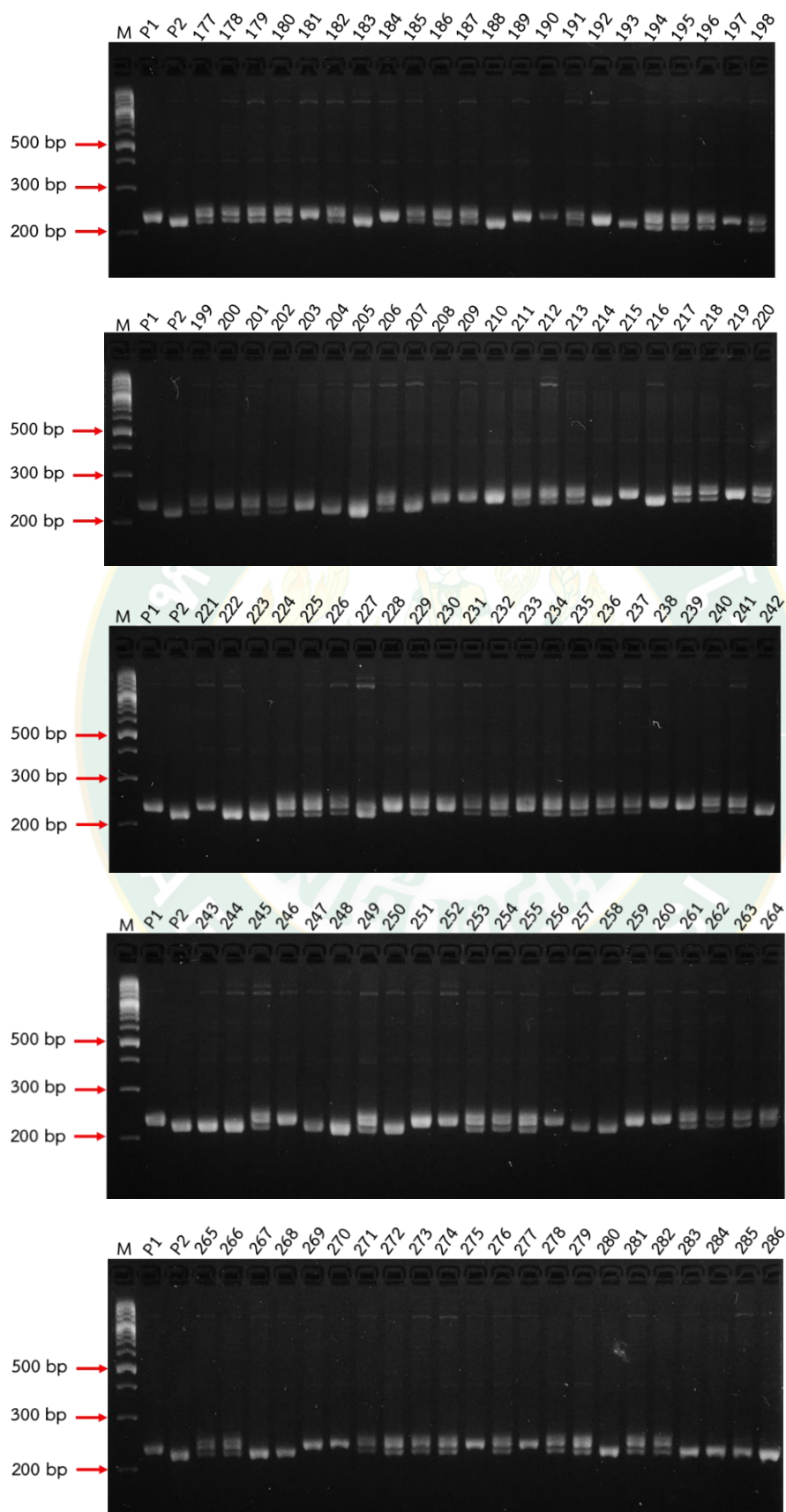


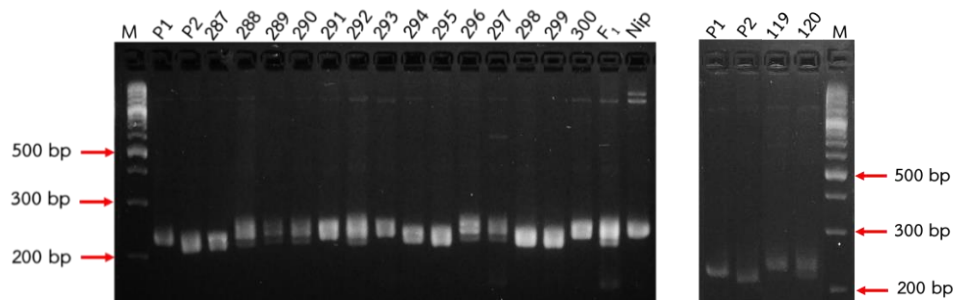
ภาพผนวกที่ 6 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ในประชากร F_2 ตัวเลข 1-300 คือ ต้นที่ 1-300, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, F_1 คือ ลูกผสมชั่วที่ 1, Nip คือ Nipponbare, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

1.3 เครื่องหมาย RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3*





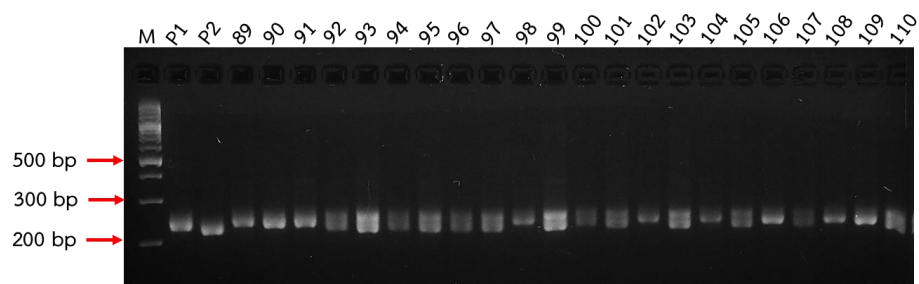
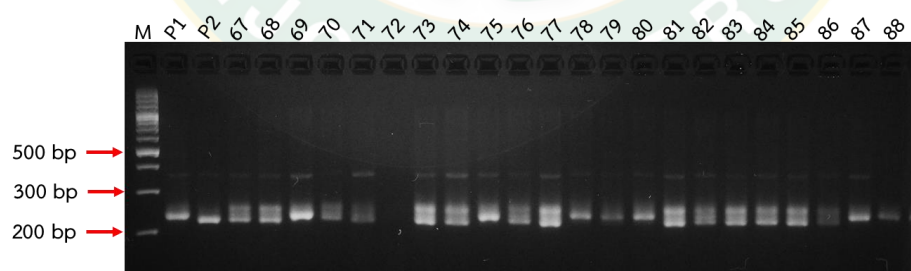
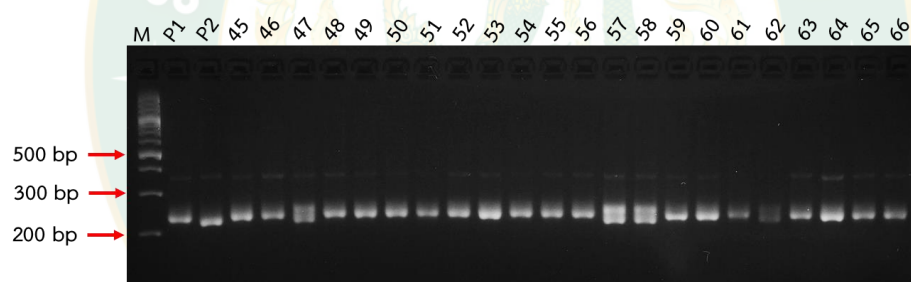
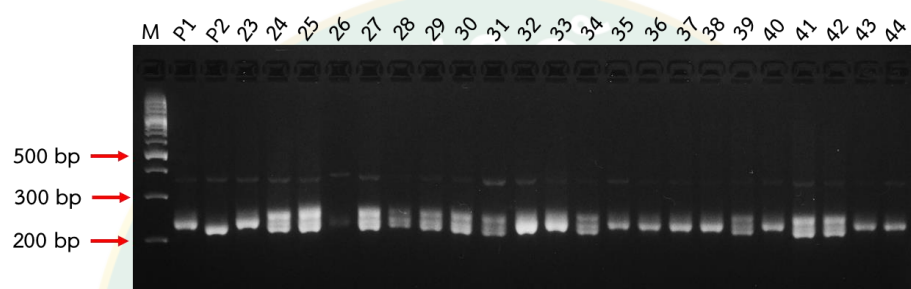
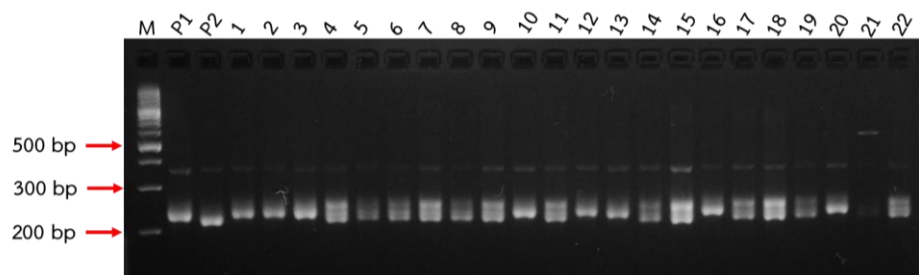


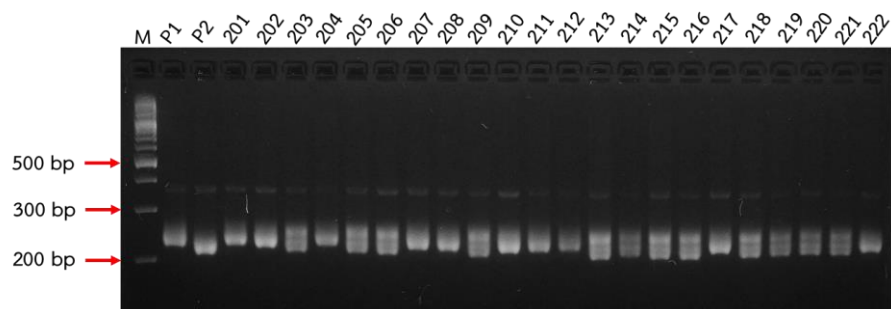
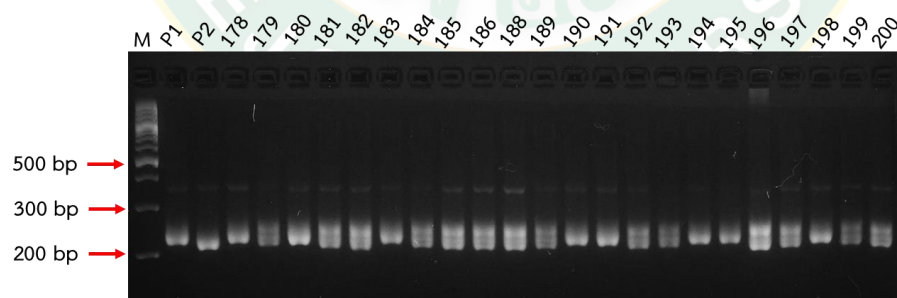
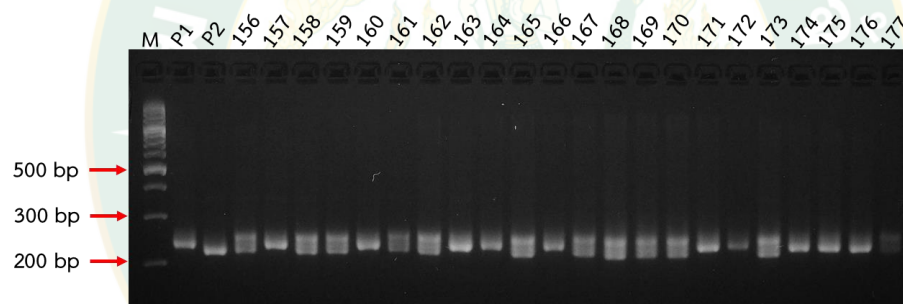
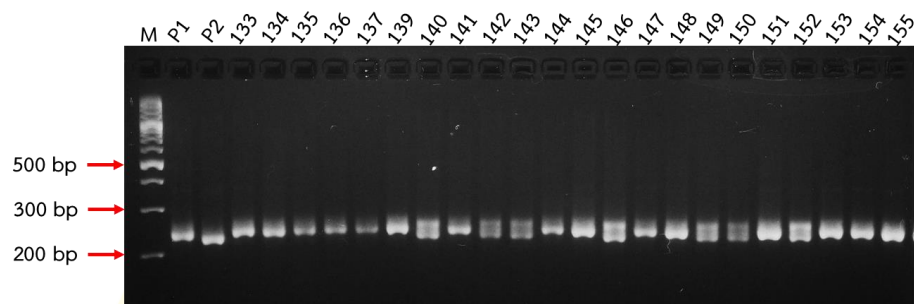
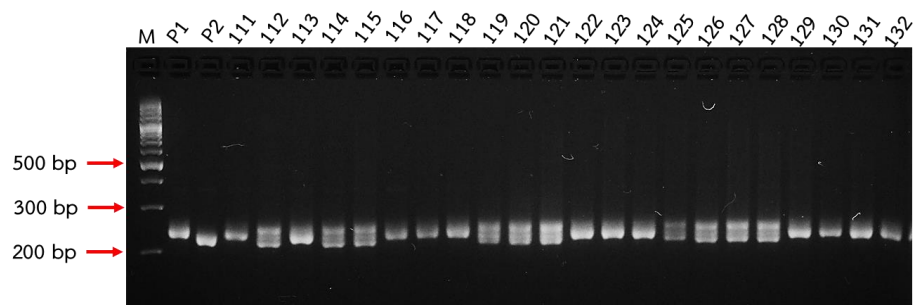


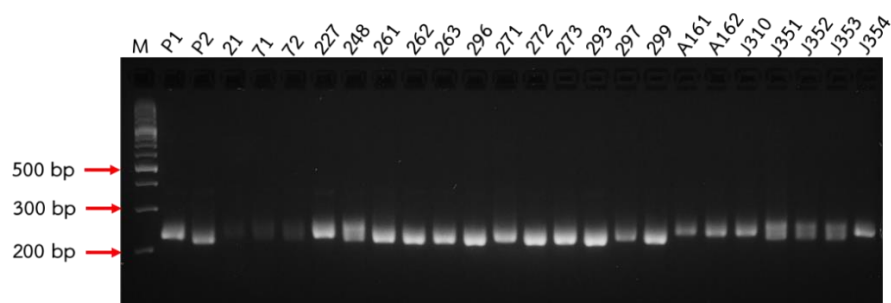
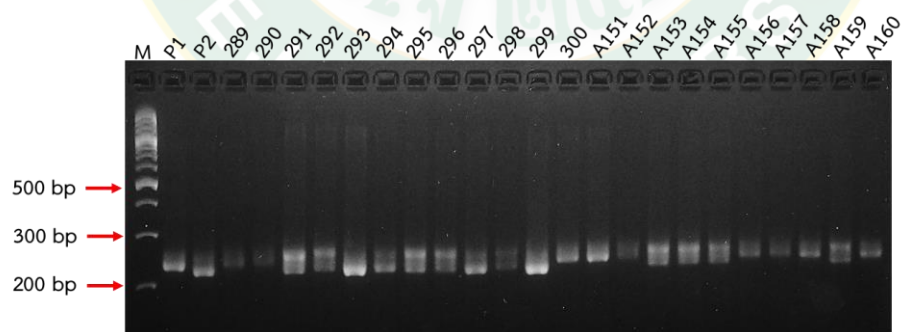
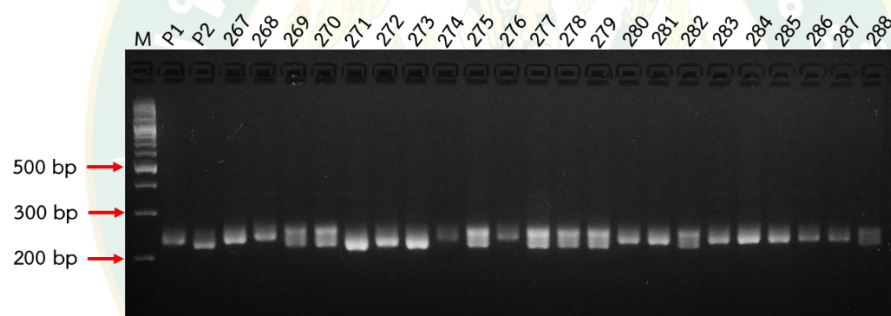
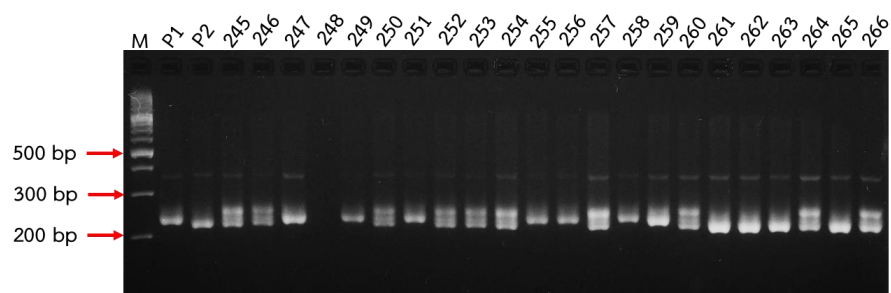
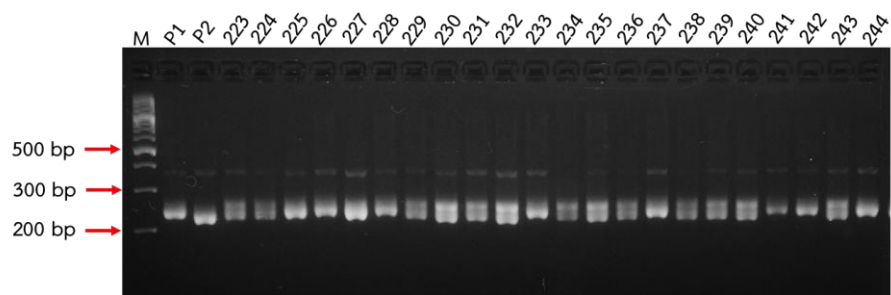
ภาพผนวกที่ 7 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* ในประชากร F_2 ตัวเลข 1-300 คือ ต้นที่ 1-300, และผลการตรวจสอบซ้ำ ต้นที่ 119 และ 120, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, F_1 คือ ลูกผสมชั่วที่ 1, Nip คือ Nipponbare, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

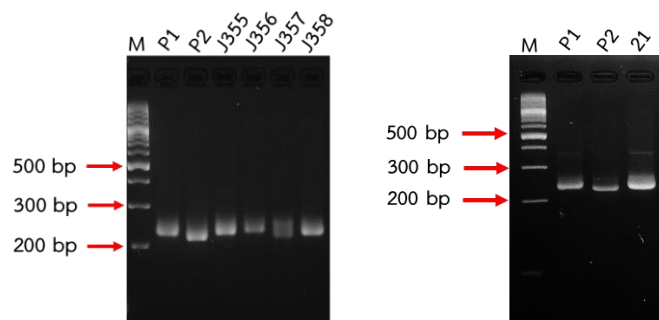
2. การตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากร BC₁F₁

2.1 เครื่องหมาย RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*

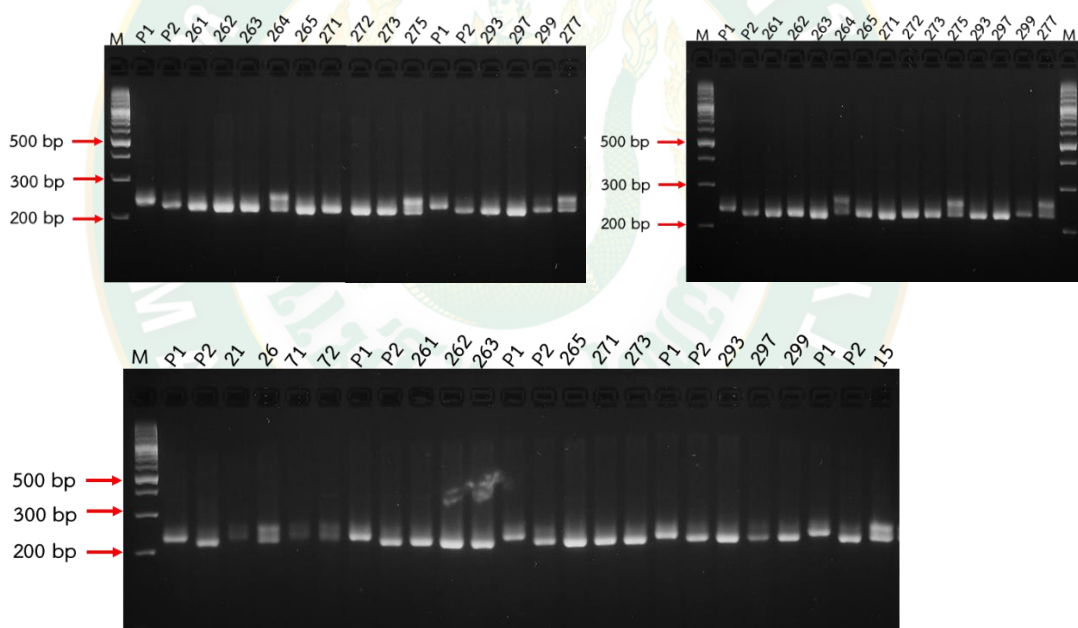






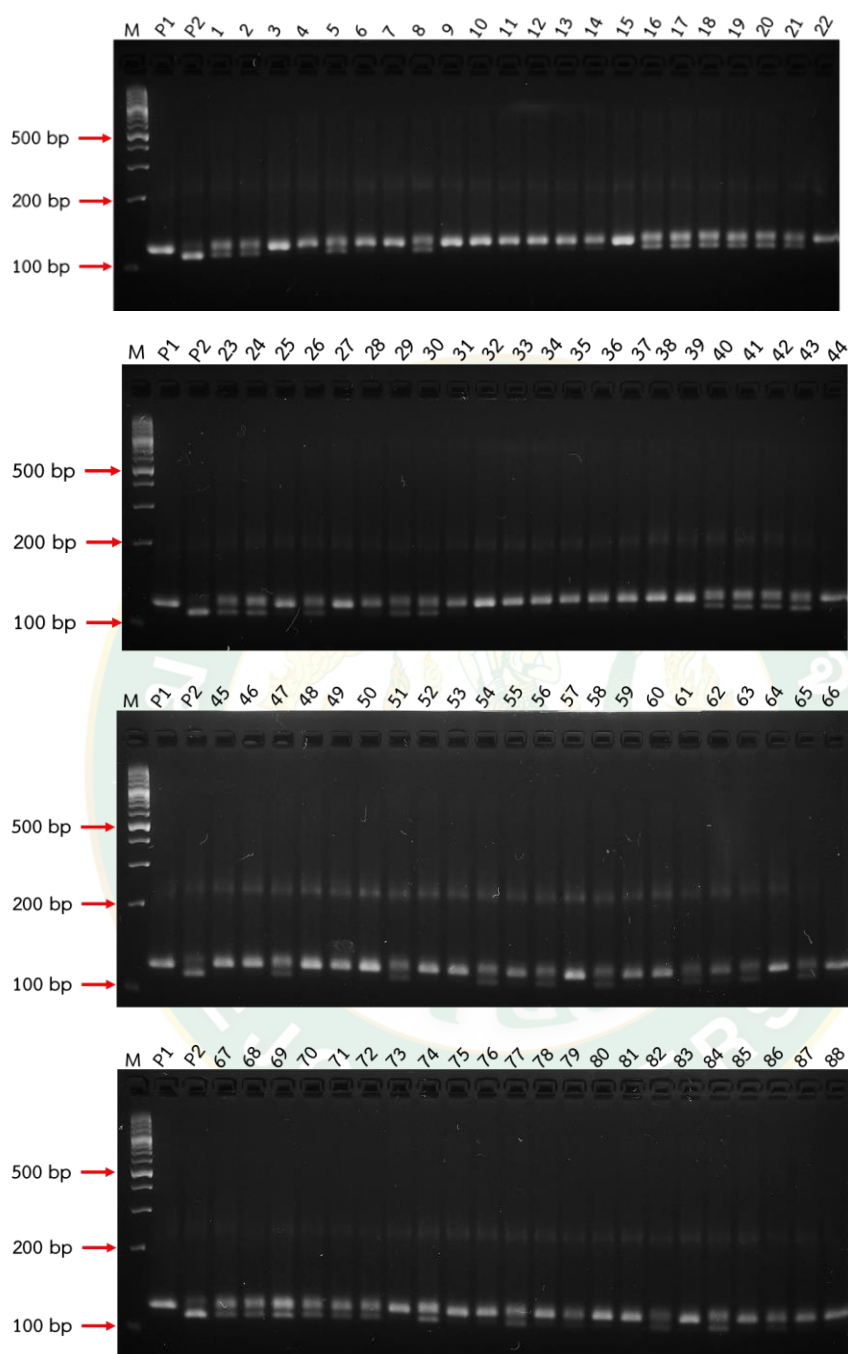


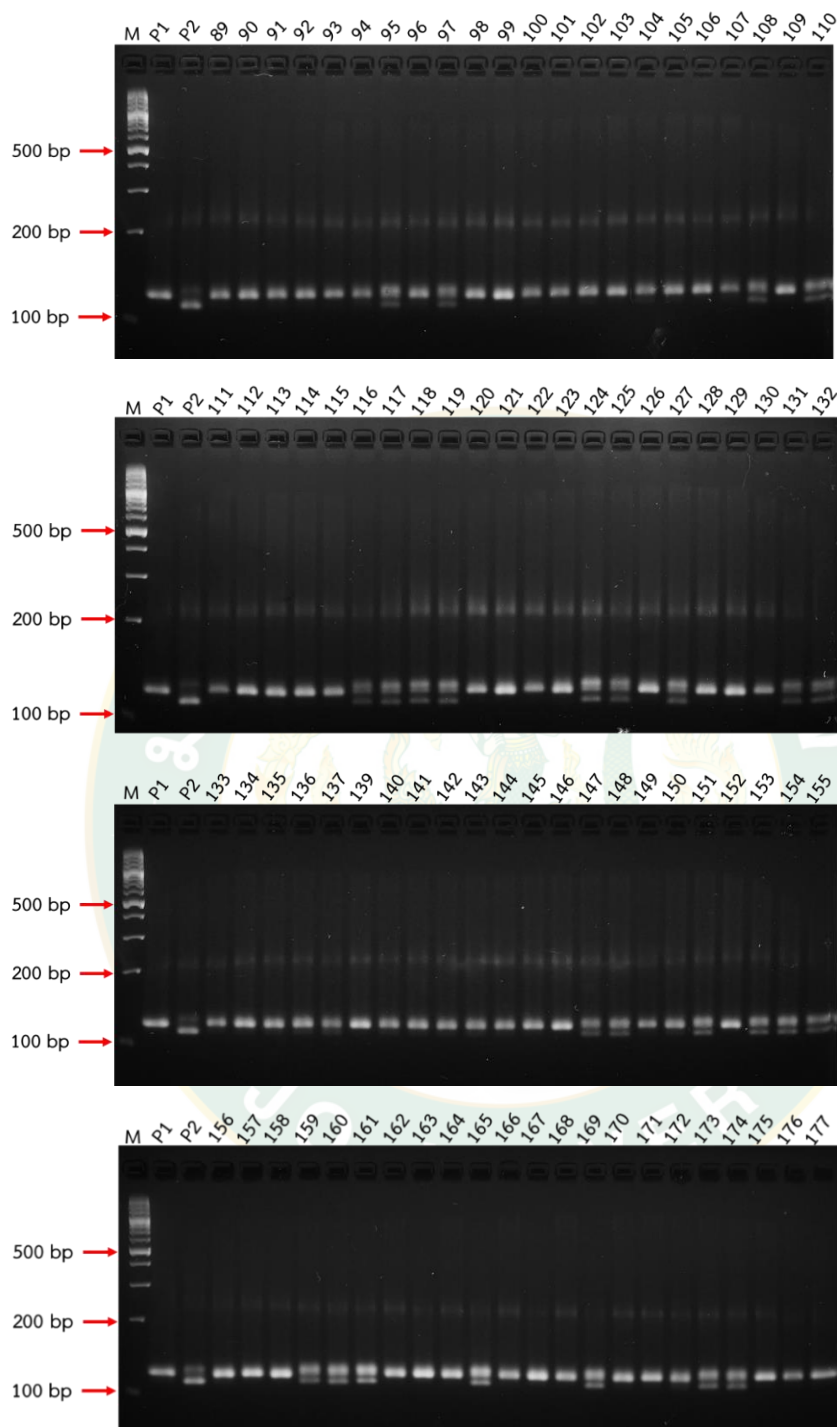
ภาพผนวกที่ 8 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* ในประชากร BC₁F₁ ตัวเลข 1-J358 คือ ต้นที่ 1-321, และต้นที่ 21 ตรวจสอบครั้งที่ 2, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

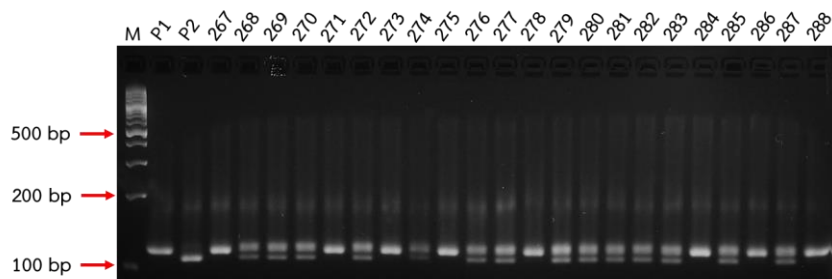
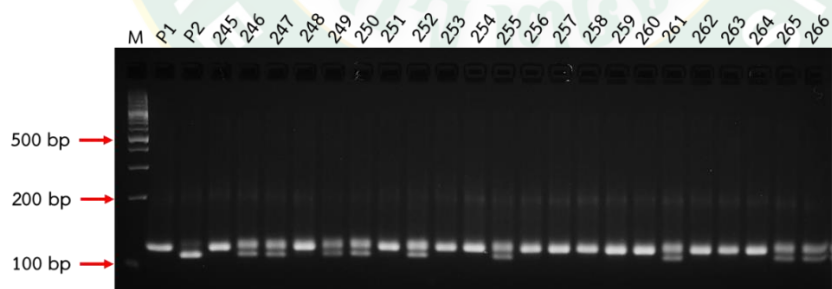
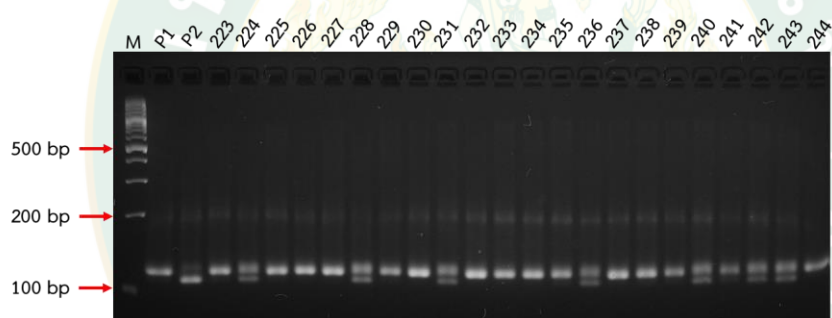
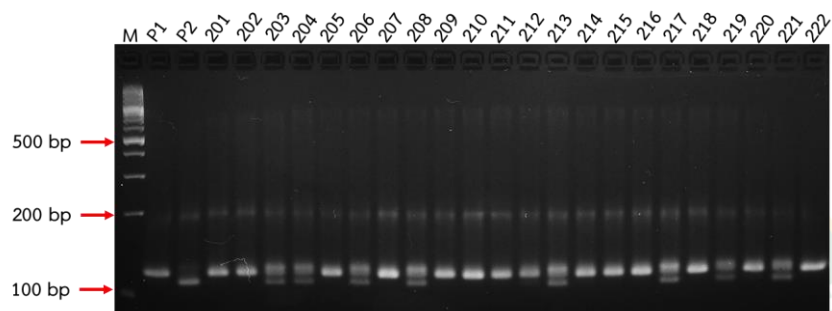
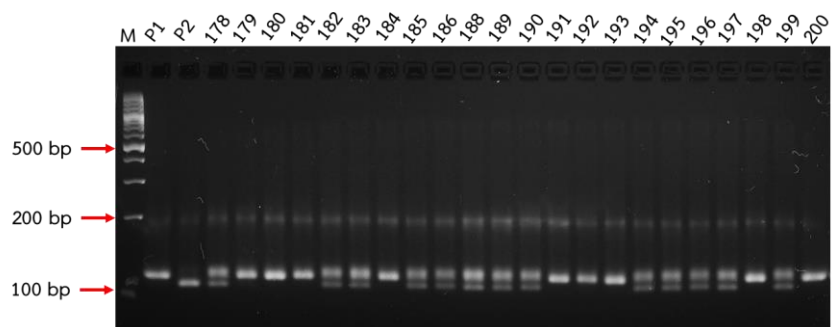


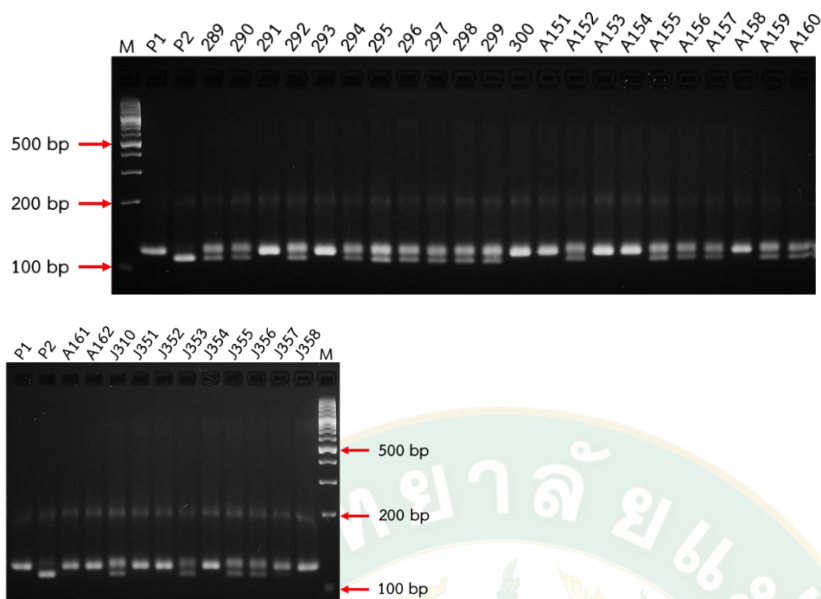
ภาพผนวกที่ 9 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* ในประชากร BC₁F₁ ครั้งที่ 2 จำนวน 10 ต้น ที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อยจำนวน 1 แถบ คือ ต้นที่ 261, 262, 263, 265, 271, 272, 273, 293, 297 และ 299, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

2.2 เครื่องหมาย RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR*



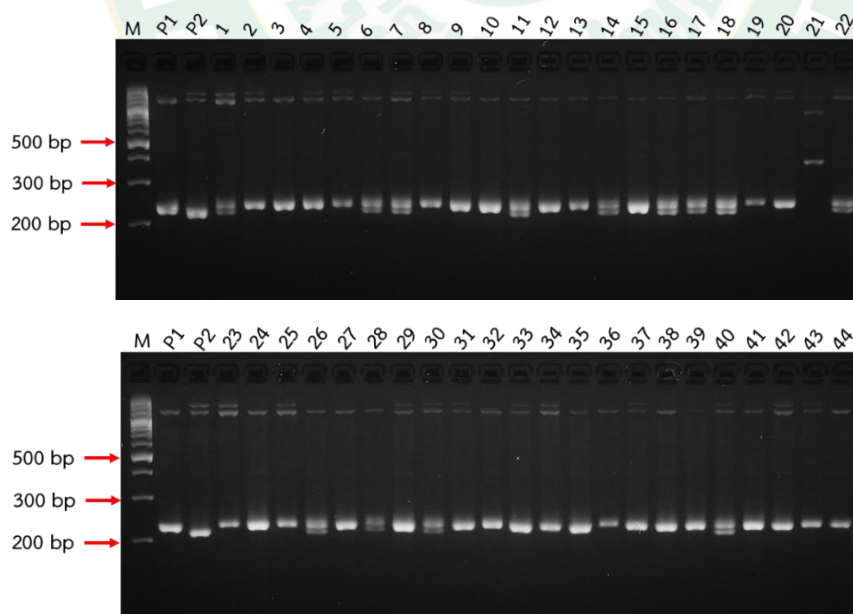


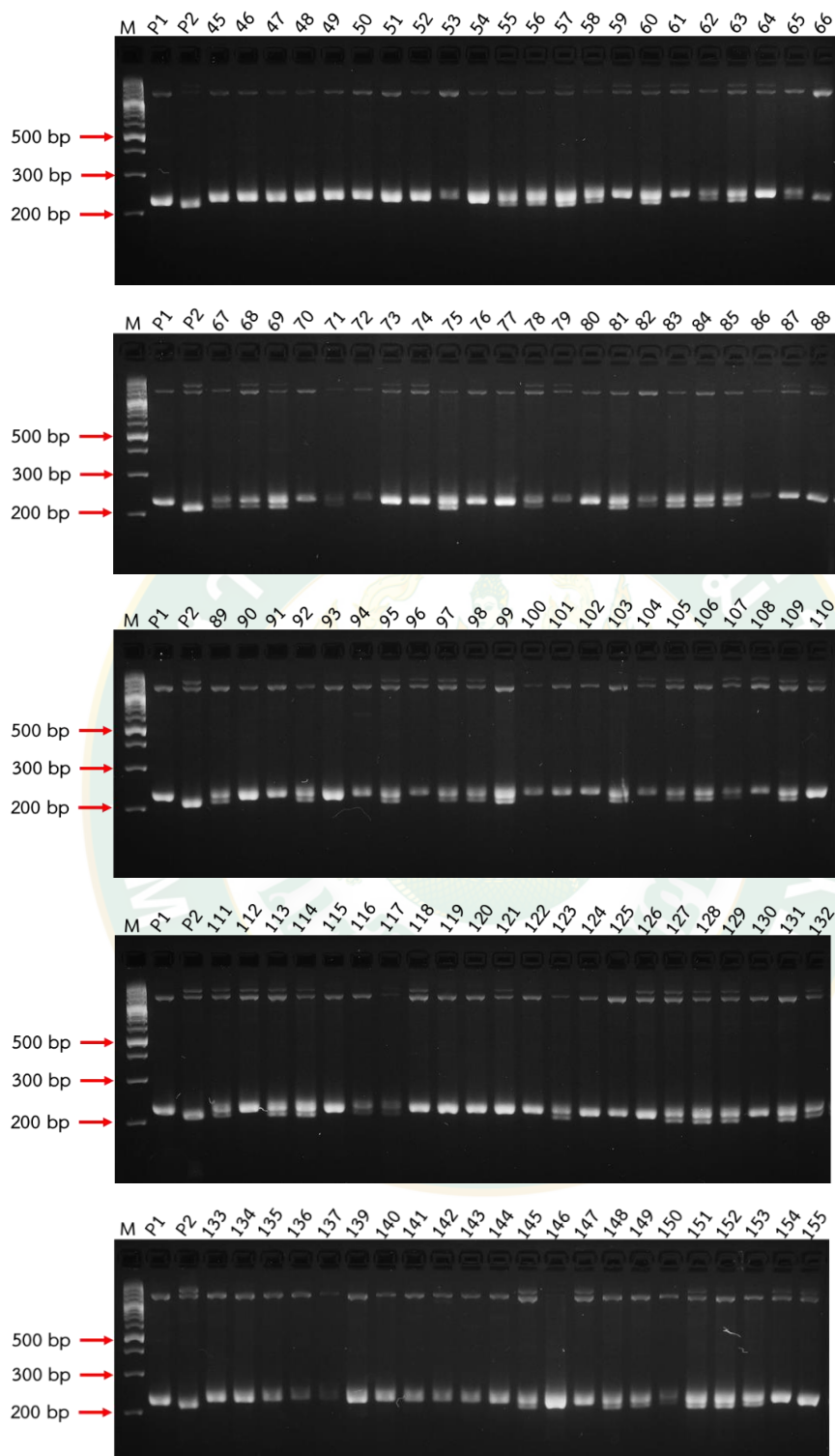


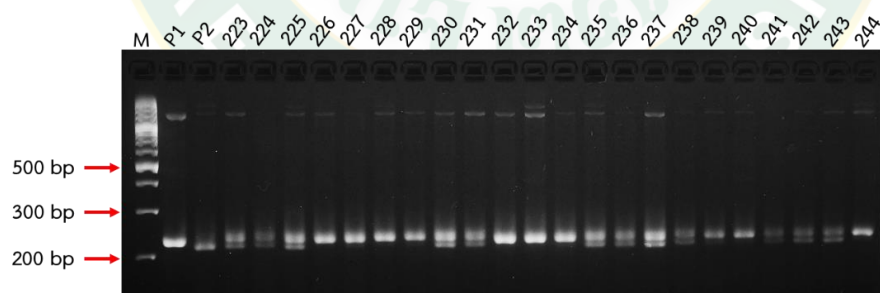
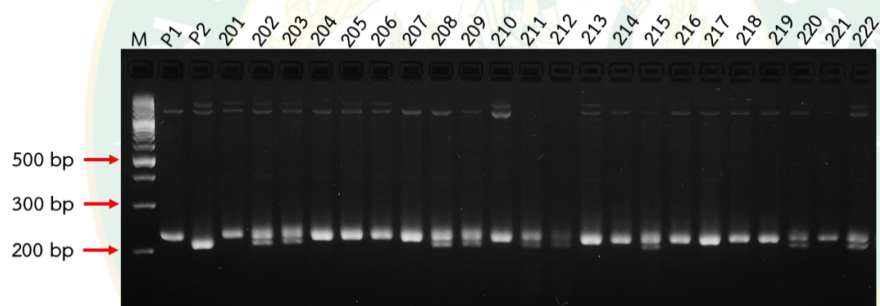
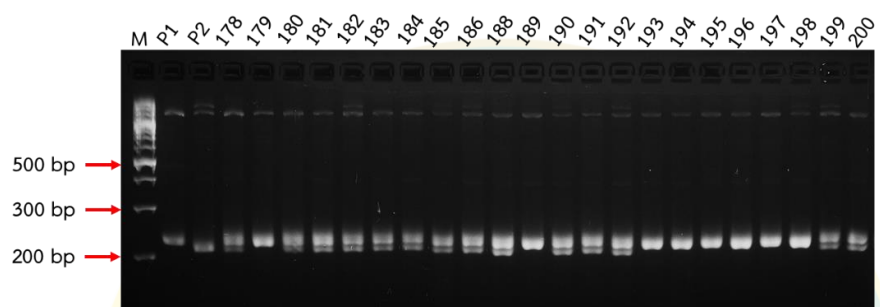
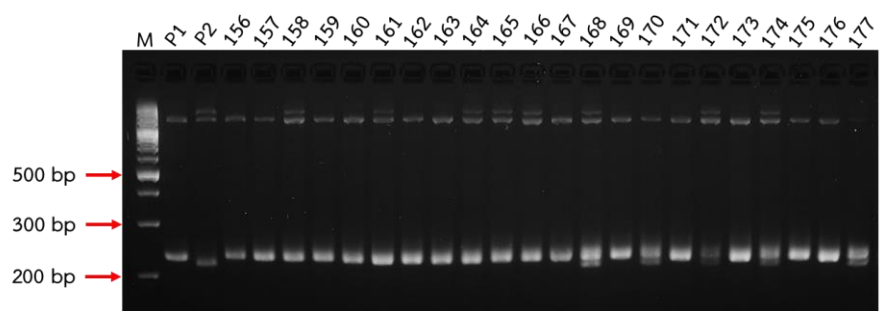


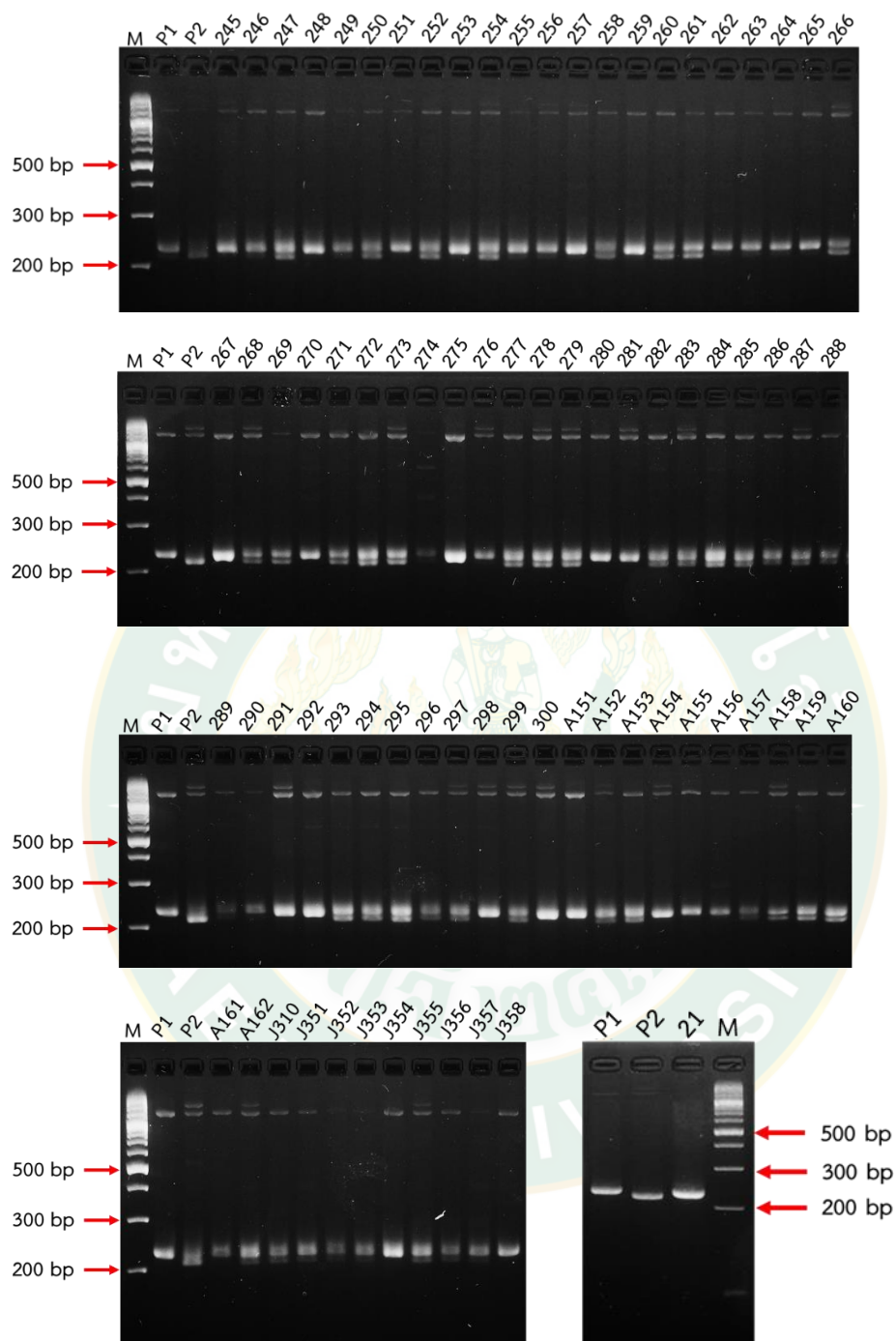
ภาพผนวกที่ 10 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ใน ประชากร BC₁F₁ ตัวเลข 1-J358 คือ ต้นที่ 1-318, P1 คือ พันธุ์รับปทุมธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้กำเนิด, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

2.3 เครื่องหมาย RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3*









ภาพผนวกที่ 11 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* ในประชากร BC₁F₁ ตัวเลข 1-J358 คือ ต้นที่ 1-318, ต้นที่ 21 ตรวจสอบซ้ำ P1 คือ พันธุ์รับพุ่มธานี 1, P2 คือ พันธุ์ให้ก้าน้อย, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



ภาคผนวก ค

ข้อมูลจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร F_2 และ BC_1F_1

1. ประชากร F_2

ต้นที่	RM17321 (OsB1&B2)	RM11383 (OsDFR)	RM15209 (OsMYB3)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ต้นที่	RM17321 (OsB1&B2)	RM11383 (OsDFR)	RM15209 (OsMYB3)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ
1	KP	KP	KP	6.03	51	KP	KP	KP	4.88
2	KK	PP	KP	9.75	52	KP	KK	KP	1.97
3	PP	KP	KP	1.41	53	KP	KP	KP	3.48
4	KP	PP	PP	2.43	54	KP	KK	KP	4.52
5	KP	KK	KK	4.64	55	KP	KP	PP	3.63
6	PP	KP	KP	2.18	56	KP	KP	PP	2.23
7	PP	KP	PP	1.29	57	KK	KP	KP	4.71
8	KK	KK	KP	4.80	58	KK	KP	KP	5.62
9	PP	KP	KK	1.85	59	KP	KP	KP	1.98
10	PP	KP	PP	1.11	60	KP	KP	PP	2.47
11	PP	PP	PP	1.60	61	KP	PP	KP	3.91
12	KP	KP	KP	4.80	62	PP	PP	KP	2.02
13	KK	KP	KP	9.47	63	KP	KP	KP	4.59
14	KP	KP	KP	2.66	64	KP	KK	KP	2.81
15	PP	KP	KP	1.02	65	KP	PP	KK	3.06
16	KP	KK	PP	4.07	66	PP	KP	KP	1.13
17	KK	KK	KK	7.95	67	KP	KP	KP	6.28
18	KK	KP	PP	3.09	68	KK	KP	PP	4.40
19	KP	KP	PP	3.61	69	KP	KP	PP	2.48
20	PP	KP	KK	1.31	70	KK	KP	PP	5.70
21	KP	KP	KK	2.85	71	KK	KP	KK	7.14
22	KK	KP	PP	3.42	72	PP	KK	KK	1.09
23	KP	KK	KK	3.07	73	KP	KK	PP	3.39
24	KK	KK	KP	3.96	74	PP	KK	KK	1.68
25	PP	KK	KK	1.66	75	KP	KP	KP	3.31
26	KP	KK	PP	2.86	76	KK	KP	PP	5.65
27	PP	KP	PP	1.93	77	KK	KK	KK	4.49
28	KP	KP	KK	5.20	78	KP	KK	PP	2.42
29	KK	KK	PP	3.09	79	PP	KP	KK	1.16
30	PP	KP	KP	1.88	80	PP	PP	PP	0.98
31	KP	KP	KP	2.95	81	KP	KP	KK	8.20
32	KP	PP	KK	2.40	82	KP	KP	KP	5.50
33	KK	KP	PP	2.92	83	KK	KK	KP	7.99
34	KK	KK	KP	4.12	84	KP	PP	PP	4.65
35	KP	KK	KP	7.41	85	PP	KP	KP	1.44
36	KP	KP	KP	4.77	86	KP	PP	KK	3.48
37	KP	KK	PP	5.24	87	KK	KP	PP	2.29
38	KP	PP	PP	4.04	88	KP	PP	KP	2.59
39	KP	KP	KP	3.66	89	KP	KP	KP	2.89
40	KP	PP	KK	3.57	90	KP	PP	PP	5.30
41	KP	KP	PP	2.50	91	PP	PP	PP	1.79
42	KK	PP	KP	3.24	92	KP	KP	KK	7.95
43	PP	PP	KP	1.69	93	KK	KK	KP	4.66
44	KP	KP	KP	3.90	94	PP	KP	KP	3.61
45	KP	PP	KP	3.21	95	PP	KK	KP	1.63
46	KP	KK	KP	3.84	96	KP	PP	KP	1.71
47	KK	KK	KP	3.70	97	KP	KK	KP	4.55
48	KP	KP	KP	3.33	98	KK	KK	KK	5.17
49	KP	KK	KP	2.20	99	KK	KP	KK	7.31
50	KP	PP	KP	2.72	100	KK	KK	KP	4.37

ต้นที่	RM17321 (OsB1&B2)	RM11383 (OsDFR)	RM15209 (OsMYB3)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ต้นที่	RM17321 (OsB1&B2)	RM11383 (OsDFR)	RM15209 (OsMYB3)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ
101	PP	KP	KK	1.44	151	PP	KP	PP	0.80
102	KK	KP	PP	5.44	152	PP	KP	KP	1.71
103	KP	KP	KP	3.83	153	PP	KP	KP	1.57
104	KK	KK	KP	2.83	154	KK	KP	KP	5.31
105	KP	KP	KK	3.46	155	KP	KK	PP	2.09
106	KP	KP	PP	3.30	156	KK	KP	KK	7.64
107	KP	KP	PP	3.01	157	KK	KP	PP	2.58
108	PP	KP	KP	1.84	158	KP	PP	KP	3.16
109	PP	PP	KK	1.12	159	KK	KP	KP	3.42
110	KK	KK	KP	6.10	160	PP	PP	KK	1.18
111	KP	KP	KK	5.47	161	KP	PP	KK	2.99
112	KP	KP	KP	3.61	162	PP	KP	PP	1.53
113	PP	KK	KP	1.56	163	KK	PP	KP	2.48
114	PP	KK	KP	1.46	164	PP	KP	KP	1.60
115	KP	KP	KP	1.98	165	KP	KK	PP	4.21
116	KK	KK	KP	4.19	166	KP	KK	PP	3.12
117	KP	KP	KP	2.39	167	PP	PP	KP	1.61
118	KP	KP	KP	3.23	168	KP	KK	KP	2.00
119	KP	PP	PP	2.08	169	PP	KP	PP	1.71
120	PP	KK	KP	1.45	170	KP	KP	KP	2.89
121	KK	KP	PP	3.56	171	KK	KP	KK	7.95
122	KP	KP	KK	3.94	172	KP	KP	KP	2.11
123	PP	KK	KP	1.97	173	KK	KP	PP	3.35
124	KP	PP	PP	2.87	174	KP	KP	KP	3.11
125	KP	PP	PP	1.42	175	KP	KP	KP	2.04
126	KP	KP	KP	3.14	176	KP	KP	KP	2.91
127	KP	KK	KK	3.57	177	KP	KP	KP	5.21
128	KP	PP	KK	2.23	178	KP	PP	KP	2.32
129	PP	PP	PP	1.48	179	KK	KK	KP	5.38
130	KP	KP	KP	5.18	180	KP	KP	KP	3.19
131	KP	KP	KK	2.34	181	KP	PP	PP	2.36
132	PP	KP	KP	2.53	182	PP	KP	KP	3.40
133	KP	KP	PP	2.48	183	KK	PP	KK	6.49
134	KP	KP	KP	3.64	184	KP	PP	PP	2.25
135	KK	KP	PP	2.64	185	KP	KP	KP	4.47
136	KK	PP	KP	4.44	186	KP	KK	KP	4.74
137	KP	KP	KP	3.46	187	KK	KP	KP	5.36
138	PP	KK	PP	2.10	188	KK	PP	KK	5.53
139	KK	KK	KK	4.25	189	KK	KP	PP	4.51
140	PP	KP	KP	1.55	190	KP	KK	PP	2.53
141	PP	KP	KP	1.72	191	PP	KK	KP	0.81
142	PP	KK	KP	2.50	192	KK	KP	PP	3.41
143	KK	PP	KP	2.64	193	KK	KP	KK	3.28
144	PP	PP	KP	1.71	194	PP	PP	KP	1.06
145	PP	KK	KK	1.68	195	KP	KK	KP	4.61
146	PP	KP	PP	1.75	196	KP	KP	KP	4.19
147	KP	PP	KP	3.00	197	KK	KP	PP	5.52
148	KP	KK	KP	2.74	198	KP	KP	KP	3.52
149	KP	KK	PP	1.92	199	PP	KK	KP	0.68
150	KP	KP	KP	3.39	200	KP	PP	PP	2.55

ต้นที่	RM17321 (OsB1&B2)	RM11383 (OsDFR)	RM15209 (OsMYB3)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ต้นที่	RM17321 (OsB1&B2)	RM11383 (OsDFR)	RM15209 (OsMYB3)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ
201	PP	KP	KP	1.21	251	KP	PP	PP	2.76
202	KK	KK	KP	3.36	252	PP	PP	PP	1.59
203	KP	PP	PP	1.29	253	KP	KP	KP	4.08
204	KK	KK	KK	5.69	254	PP	KP	KP	2.06
205	KP	PP	KK	3.65	255	PP	KP	KP	1.15
206	KP	KK	KP	3.40	256	KP	KP	PP	4.26
207	KK	KP	KK	4.49	257	PP	KP	KK	2.03
208	KP	KK	PP	4.28	258	KP	KP	KK	2.67
209	KP	KK	PP	1.80	259	PP	KP	PP	1.17
210	PP	KP	PP	1.71	260	KP	KK	PP	2.76
211	KP	PP	KP	2.37	261	KK	KP	KP	6.61
212	KK	PP	KP	5.12	262	KK	KP	KP	4.78
213	KP	KP	KP	4.80	263	KP	KK	KP	2.35
214	KK	KP	KK	6.38	264	KP	KK	KP	3.77
215	KK	KP	PP	4.13	265	KP	KK	KP	4.51
216	KP	KP	KK	3.09	266	KP	KP	KP	3.40
217	KK	PP	KP	2.43	267	PP	PP	KK	1.59
218	KK	PP	KP	3.53	268	PP	PP	KK	1.67
219	KP	KK	PP	1.66	269	KP	KP	PP	2.48
220	KP	KP	KP	2.58	270	KP	KK	PP	3.49
221	PP	KP	PP	1.36	271	KP	KP	KP	2.52
222	KP	KP	KK	2.98	272	KP	KP	KP	4.75
223	KP	PP	KK	3.55	273	PP	KK	KP	1.35
224	KP	PP	KP	3.28	274	KK	KP	KP	3.66
225	KK	KK	KP	3.99	275	KP	KP	PP	2.44
226	KP	KP	KP	2.13	276	KP	KP	KP	1.86
227	KK	KP	KK	5.72	277	KP	PP	PP	2.98
228	KP	KP	PP	2.14	278	KP	PP	KP	3.19
229	KK	KK	KP	6.98	279	KP	PP	KP	2.47
230	PP	KK	PP	3.07	280	KP	KP	KK	1.99
231	KP	KP	KP	4.46	281	KK	KP	KP	4.94
232	KP	KP	KP	3.02	282	KP	PP	KP	3.02
233	KK	KK	PP	3.27	283	KK	KK	KK	4.26
234	KP	KP	KP	2.16	284	KP	KK	KK	5.65
235	KK	PP	KP	3.45	285	KP	PP	KK	3.38
236	KP	KP	KP	2.87	286	KP	KK	KK	3.91
237	KP	KP	KP	5.25	287	KK	KP	KK	6.10
238	KP	KK	PP	2.67	288	KP	PP	KP	3.34
239	KP	PP	PP	3.91	289	KP	PP	KP	3.64
240	KP	PP	KP	4.94	290	KK	KP	KP	4.58
241	KK	PP	KP	2.95	291	KK	KP	PP	4.68
242	PP	KP	KK	1.67	292	KP	KP	KP	1.58
243	KP	KP	KK	3.77	293	PP	KP	PP	1.74
244	KK	KK	KK	4.41	294	KP	KP	KK	6.38
245	PP	KP	KP	1.66	295	PP	KK	KK	1.13
246	KP	KK	PP	2.12	296	PP	KP	KP	1.65
247	KK	KP	KK	6.09	297	PP	KP	KP	1.14
248	KP	KP	KK	8.60	298	KP	PP	KK	4.55
249	PP	KP	KP	1.35	299	KP	KP	KK	8.54
250	KP	KP	KK	3.94	300	PP	KP	PP	1.58

ภาพผนวกที่ 12 จีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น

2. ประชากร BC₁F₁

plot ที่	ต้นที่	RM17321 (<i>OsB1&B2</i>)	RM11383 (<i>OsDFR</i>)	RM15209 (<i>OsMYB3</i>)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ปริมาณแอน โทไซยานิน	สีเยื่อหุ้ม เมล็ด
2001	1	PP	KP	KP	2.3	0.00	ขาว
2002	2	PP	KP	PP	1.8	0.00	ขาว
2003	3	PP	PP	PP	1.5	0.00	ขาว
2004	4	KP	PP	PP	-	-	-
2005	5	KP	KP	PP	2.4	1.43	ดำ
2006	6	KP	PP	KP	3.7	3.26	ดำ
2007	7	KP	PP	KP	2.3	3.73	ดำ
2008	8	KP	KP	PP	4.8	6.85	ดำ
2009	9	KP	PP	PP	2.4	-	น้ำตาล
2010	10	PP	PP	PP	-	-	-
2011	11	KP	PP	KP	4.9	15.08	น้ำตาล
2012	12	PP	PP	PP	1.4	0.00	ขาว
2013	13	PP	PP	PP	2.0	-	ขาว
2014	14	KP	PP	KP	5.2	22.37	ดำ
2015	15	KP	PP	PP	-	-	-
2016	16	PP	KP	KP	1.2	0.12	ขาว
2017	17	KP	KP	KP	5.4	-	ดำ
2018	18	KP	KP	KP	-	-	-
2019	19	KP	KP	PP	1.7	2.45	น้ำตาล
2020	20	PP	KP	PP	1.4	0.00	ขาว
2021	21	PP	KP	PP	0.9	0.00	ขาว
2022	22	KP	PP	KP	0.6	0.27	ขาว
2023	23	PP	KP	PP	0.6	0.00	ขาว
2024	24	KP	KP	PP	1.5	0.00	น้ำตาล
2025	25	KP	PP	PP	4.4	11.00	ดำ
2026	26	KP	KP	KP	-	-	-
2027	27	KP	PP	PP	2.9	5.18	น้ำตาล
2028	28	KP	PP	KP	2.7	4.67	ดำ
2029	29	KP	KP	PP	5.1	9.07	ดำ
2030	30	KP	KP	KP	3.8	4.78	ดำ
2031	31	KP	PP	PP	1.7	2.10	น้ำตาล
2032	32	PP	PP	PP	0.4	0.00	ขาว
2033	33	PP	PP	PP	0.9	0.22	ขาว
2034	34	KP	PP	PP	3.9	10.04	ดำ
2035	35	PP	PP	PP	1.4	0.49	ขาว
2036	36	PP	PP	PP	1.1	0.00	ขาว
2037	37	PP	PP	PP	1.1	0.00	ขาว
2038	38	PP	PP	PP	3.7	0.00	ขาว
2039	39	KP	PP	PP	-	-	ดำ
2040	40	PP	KP	KP	-	-	-
2041	41	KP	KP	PP	-	-	-
2042	42	KP	KP	PP	1.6	4.02	ดำ
2043	43	PP	KP	PP	-	-	-
2044	44	PP	PP	PP	0.3	-	ขาว
2045	45	PP	PP	PP	0.8	0.00	ขาว
2046	46	PP	PP	PP	3.8	0.00	ขาว
2047	47	KP	KP	PP	1.2	6.24	ดำ
2048	48	PP	PP	PP	1.0	0.00	ขาว
2049	49	PP	PP	PP	1.0	0.00	ขาว
2050	50	PP	PP	PP	1.5	0.00	ขาว

plot ที่	ต้นที่	RM17321 (<i>OsB1&B2</i>)	RM11383 (<i>OsDFR</i>)	RM15209 (<i>OsMYB3</i>)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ปริมาณแอน โทไซยานิน	สีเหี่ยวหุ้ม เมล็ด
2051	51	PP	KP	PP	1.1	0.35	ขาว
2052	52	PP	PP	PP	1.0	0.40	ขาว
2053	53	PP	PP	PP	-	-	-
2054	54	PP	KP	PP	-	-	ขาว
2055	55	PP	PP	KP	1.4	0.60	ขาว
2056	56	PP	KP	KP	1.3	0.00	ขาว
2057	57	KP	PP	KP	3.9	10.93	ดำ
2058	58	KP	KP	KP	2.2	4.32	ดำ
2059	59	PP	PP	PP	1.5	0.00	ขาว
2060	60	PP	PP	KP	0.2	0.00	ขาว
2061	61	PP	KP	PP	0.8	0.00	ขาว
2062	62	KP	PP	KP	-	-	-
2063	63	PP	KP	KP	0.5	0.57	ขาว
2064	64	PP	PP	PP	1.5	-	ขาว
2065	65	PP	KP	KP	-	-	ขาว
2066	66	PP	PP	KP	1.5	0.00	ขาว
2067	67	KP	KP	KP	1.5	1.00	ขาว
2068	68	KP	KP	KP	3.0	4.09	ดำ
2069	69	PP	KP	KP	1.4	0.00	ขาว
2070	70	KP	KP	PP	4.4	11.71	ดำ
2071	71	KP	KP	KP	4.2	5.74	ดำ
2072	72	KP	KP	PP	5.1	19.15	ดำ
2073	73	KP	PP	PP	2.9	1.76	ดำ
2074	74	KP	KP	PP	-	-	-
2075	75	PP	PP	KP	1.3	0.00	ขาว
2076	76	KP	PP	PP	3.0	2.17	น้ำตาล
2077	77	KP	KP	PP	3.0	6.26	ดำ
2078	78	PP	PP	KP	1.3	0.00	ขาว
2079	79	PP	PP	PP	2.3	0.00	ขาว
2080	80	PP	PP	PP	1.5	0.00	ขาว
2081	81	KP	PP	KP	4.9	5.97	ดำ
2082	82	KP	KP	KP	4.5	10.38	ดำ
2083	83	KP	PP	KP	2.5	3.38	ดำ
2084	84	KP	KP	KP	6.6	7.81	ดำ
2085	85	KP	PP	KP	3.8	12.77	ดำ
2086	86	PP	PP	PP	1.4	0.14	ขาว
2087	87	PP	PP	PP	2.3	0.90	ขาว
2088	88	PP	PP	PP	1.5	-	ขาว
2089	89	PP	PP	KP	4.9	0.00	ขาว
2090	90	PP	PP	PP	-	-	ขาว
2091	91	PP	PP	PP	4.5	0.46	ขาว
2092	92	KP	PP	KP	-	-	-
2093	93	KP	PP	PP	2.5	3.94	ดำ
2094	94	KP	PP	PP	6.6	2.89	ดำ
2095	95	KP	KP	KP	3.8	10.67	ดำ
2096	96	KP	PP	PP	1.4	7.68	ดำ
2097	97	KP	KP	KP	2.5	1.47	น้ำตาล
2098	98	PP	PP	KP	0.7	0.00	ขาว
2099	99	KP	PP	KP	6.6	10.14	ดำ
2100	100	KP	PP	PP	1.9	2.46	ดำ

plot ที่	ต้นที่	RM17321 (<i>OsB1&B2</i>)	RM11383 (<i>OsDFR</i>)	RM15209 (<i>OsMYB3</i>)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ปริมาณแอน โทไซยานิน	สีเยื่อหุ้ม เมล็ด
2101	101	KP	PP	PP	2.7	-	ดำ
2102	102	PP	PP	PP	0.8	0.00	ขาว
2103	103	KP	PP	KP	3.5	8.31	ดำ
2104	104	PP	PP	PP	1.4	0.00	ขาว
2105	105	KP	PP	KP	4.3	0.31	ดำ
2106	106	PP	PP	KP	-	-	-
2107	107	KP	PP	KP	4.8	12.35	ดำ
2108	108	PP	KP	PP	1.8	0.00	ขาว
2109	109	PP	PP	KP	1.7	0.30	ขาว
2110	110	KP	KP	PP	3.1	0.33	น้ำตาล
2111	111	PP	PP	KP	1.7	0.00	ขาว
2112	112	KP	PP	PP	3.2	2.60	น้ำตาล
2113	113	PP	PP	KP	1.4	0.00	ขาว
2114	114	KP	PP	KP	5.0	8.90	ดำ
2115	115	KP	PP	PP	2.5	10.04	ดำ
2116	116	PP	KP	KP	1.6	0.00	ขาว
2117	117	PP	KP	KP	1.4	0.00	ขาว
2118	118	PP	KP	PP	1.8	0.00	ขาว
2119	119	KP	KP	PP	4.3	4.96	ดำ
2120	120	KP	PP	PP	3.9	6.14	ดำ
2121	121	KP	PP	PP	4.2	7.53	ดำ
2122	122	PP	PP	PP	0.2	0.00	ขาว
2123	123	PP	PP	KP	0.4	1.19	ขาว
2124	124	PP	KP	PP	0.4	0.00	ขาว
2125	125	KP	KP	PP	0.8	4.11	ดำ
2126	126	KP	PP	PP	2.2	3.20	น้ำตาล
2127	127	KP	KP	KP	4.3	11.04	ดำ
2128	128	KP	PP	KP	5.1	10.05	ดำ
2129	129	PP	PP	KP	2.8	-	ขาว
2130	130	PP	PP	PP	1.0	-	ขาว
2131	131	PP	KP	KP	0.8	0.00	ขาว
2132	132	PP	KP	KP	-	-	ขาว
2133	151	PP	KP	KP	1.6	0.00	ขาว
2134	152	KP	PP	KP	3.9		ดำ
2135	153	PP	KP	KP	1.1	0.00	ขาว
2136	154	PP	KP	PP	1.6	0.51	ขาว
2137	155	PP	KP	PP	2.0	0.33	ขาว
2138	156	KP	PP	PP	2.2	-	ดำ
2139	157	PP	PP	PP	1.1	0.00	ขาว
2140	158	KP	PP	PP	2.0	2.78	น้ำตาล
2141	159	KP	KP	PP	1.5	2.33	น้ำตาล
2142	160	PP	KP	PP	-	-	ขาว
2143	161	KP	KP	PP	-	-	-
2144	162	KP	PP	PP	3.5	6.92	ดำ
2145	163	PP	PP	PP	1.0	0.00	ขาว
2146	164	PP	PP	PP	-	-	ขาว
2147	165	KP	KP	PP	2.0	2.31	น้ำตาล
2148	166	PP	PP	PP	1.9	0.00	ขาว
2149	167	KP	PP	PP	4.0	3.02	น้ำตาล
2150	168	KP	PP	KP	5.8	18.33	ดำ

plot ที่	ต้นที่	RM17321 (<i>OsB1&B2</i>)	RM11383 (<i>OsDFR</i>)	RM15209 (<i>OsMYB3</i>)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ปริมาณแอน โทไซยานิน	สีเยื่อหุ้ม เมล็ด
2151	169	KP	KP	PP	-	-	-
2152	170	KP	PP	KP	9.3	26.45	ดำ
2153	171	PP	PP	PP	1.4	0.00	ขาว
2154	172	PP	PP	KP	1.2	0.00	ขาว
2155	173	KP	KP	PP	3.4	5.41	ดำ
2156	174	PP	KP	KP	2.0	0.00	ขาว
2157	175	PP	PP	PP	1.9	0.00	ขาว
2158	176	PP	PP	PP	1.6	0.00	ขาว
2159	177	KP	PP	KP	2.1	1.39	น้ำตาล
2160	178	PP	KP	KP	1.3	0.00	ขาว
2161	179	KP	PP	PP	-	-	-
2162	180	PP	PP	KP	-	-	-
2163	181	KP	PP	KP	6.0	18.79	ดำ
2164	182	KP	KP	KP	3.9	7.14	ดำ
2165	183	PP	KP	KP	-	-	-
2166	184	KP	PP	KP	5.0	7.87	ดำ
2167	185	KP	KP	KP	-	-	-
2168	186	KP	KP	KP	3.0	4.47	น้ำตาล
2169	187	-	-	-	-	-	-
2170	188	KP	KP	KP	-	-	-
2171	189	KP	KP	PP	5.3	15.67	ดำ
2172	190	PP	KP	KP	2.4	0.00	ขาว
2173	191	PP	PP	KP	1.7	0.00	ขาว
2174	192	KP	PP	KP	1.6	0.00	ขาว
2175	193	KP	PP	PP	3.8	5.78	ดำ
2176	194	PP	KP	PP	2.5	0.00	ขาว
2177	195	PP	KP	PP	1.8	0.00	ขาว
2178	196	KP	KP	PP	2.9	2.98	ดำ
2179	197	KP	KP	PP	-	-	-
2180	198	PP	PP	PP	1.9	0.00	ขาว
2181	199	KP	KP	KP	3.2	9.02	ดำ
2182	200	KP	PP	KP	5.1	5.95	ดำ
2183	201	PP	PP	PP	1.3	0.20	ขาว
2184	202	PP	PP	KP	1.8	0.00	ขาว
2185	203	KP	KP	KP	5.3	21.34	ดำ
2186	204	PP	KP	PP	1.6	0.00	ขาว
2187	205	KP	PP	PP	3.1	8.61	ดำ
2188	206	KP	KP	PP	-	-	-
2189	207	PP	PP	PP	1.7	0.00	ขาว
2190	208	PP	KP	KP	2.2	0.00	ขาว
2191	209	KP	PP	KP	-	-	-
2192	210	PP	PP	PP	1.7	0.00	ขาว
2193	211	PP	PP	KP	1.3	0.08	ขาว
2194	212	PP	PP	KP	1.0	0.87	ขาว
2195	213	KP	KP	PP	3.0	7.85	ดำ
2196	214	KP	PP	PP	2.0	3.16	น้ำตาล
2197	215	KP	PP	KP	2.9	3.41	น้ำตาล
2198	216	KP	PP	PP	1.9	0.83	น้ำตาล
2199	217	PP	KP	PP	-	-	-
2200	218	KP	PP	PP	-	-	-

plot ที่	ต้นที่	RM17321 (<i>OsB1&B2</i>)	RM11383 (<i>OsDFR</i>)	RM15209 (<i>OsMYB3</i>)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ปริมาณแอน โทไซยานิน	สีเยื่อหุ้ม เมล็ด
2201	219	KP	KP	PP	2.5	2.13	ดำ
2202	220	KP	PP	KP	2.4	5.43	ดำ
2203	221	KP	KP	PP	2.1	0.71	น้ำตาล
2204	222	PP	PP	KP	1.2	0.00	ขาว
2205	223	KP	PP	KP	4.3	6.04	น้ำตาล
2206	224	KP	KP	KP	3.2	5.19	ดำ
2207	225	PP	PP	KP	-	-	-
2208	226	PP	PP	PP	1.6	0.03	ขาว
2209	227	PP	PP	PP	1.6	0.00	ขาว
2210	228	PP	KP	PP	1.8	0.00	ขาว
2211	229	KP	PP	PP	2.2	2.55	ดำ
2212	230	KP	PP	KP	5.3	12.81	ดำ
2213	231	KP	KP	KP	5.5	7.45	ดำ
2214	232	KP	PP	PP	3.5	9.73	ดำ
2215	233	PP	PP	PP	0.5	0.00	ขาว
2216	234	KP	PP	PP	-	-	-
2217	235	KP	PP	KP	4.1	11.86	ดำ
2218	236	KP	KP	KP	5.0	14.60	ดำ
2219	237	PP	PP	KP	0.6	0.00	ขาว
2220	238	KP	PP	KP	5.3	16.50	ดำ
2221	239	KP	PP	PP	3.3	7.23	ดำ
2222	240	KP	KP	PP	3.2	3.54	ดำ
2223	241	PP	PP	KP	1.9	0.00	ขาว
2224	242	PP	KP	KP	2.1	0.00	ขาว
2225	243	KP	KP	KP	5.6	8.22	ดำ
2226	244	PP	PP	PP	2.0	0.00	ขาว
2227	245	KP	PP	PP	3.5	4.85	ดำ
2228	246	KP	KP	PP	2.8	2.69	น้ำตาล
2229	247	PP	KP	KP	2.3	0.49	ขาว
2230	248	KP	PP	PP	2.9	-	ดำ
2231	249	PP	KP	PP	1.4	0.00	ขาว
2232	250	KP	KP	KP	5.0	10.78	ดำ
2233	251	PP	PP	PP	1.8	0.00	ขาว
2234	252	KP	KP	KP	5.1	5.06	ดำ
2235	253	KP	PP	PP	3.3	3.60	ดำ
2236	254	KP	PP	KP	5.4	8.28	ดำ
2237	255	PP	KP	PP	1.8	0.13	ขาว
2238	256	PP	PP	PP	1.4	0.00	ขาว
2239	257	KP	PP	PP	5.0	5.38	ดำ
2240	258	PP	PP	KP	-	-	ขาว
2241	259	PP	PP	PP	1.7	-	ขาว
2242	260	KP	PP	KP	11.9	1.87	แดง
2243	261	KP	KP	KP	12.5	10.31	แดงดำ
2244	262	KP	PP	PP	10.3	2.41	แดงดำ
2245	263	KP	PP	PP	10.0	3.03	แดง
2246	264	KP	PP	PP	12.5	1.34	แดง
2247	265	KP	KP	PP	10.3	5.68	แดงดำ
2248	266	KP	KP	KP	11.3	3.17	แดง
2249	267	PP	PP	PP	1.7	0.00	ขาว
2250	268	PP	KP	KP	-	-	-

plot ที่	ต้นที่	RM17321 (<i>OsB1&B2</i>)	RM11383 (<i>OsDFR</i>)	RM15209 (<i>OsMYB3</i>)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ปริมาณแอน โทไซยานิน	สีเยื่อหุ้ม เมล็ด
2251	269	KP	KP	KP	8.7	2.06	แดง
2252	270	KP	KP	PP	12.4	1.77	แดง
2253	271	KP	PP	KP	12.7	9.06	แดงดำ
2254	272	KP	KP	KP	12.3	3.79	แดงดำ
2255	273	KP	PP	KP	12.6	5.11	แดงดำ
2256	274	-	-	-	-	-	-
2257	275	KP	PP	PP	1.7	0.00	ขาว
2258	276	PP	KP	PP	1.5	0.00	ขาว
2259	277	KP	KP	KP	-	-	-
2260	278	KP	PP	KP	4.9	8.56	ดำ
2261	279	KP	KP	KP	1.9	2.50	ดำ
2262	280	PP	KP	PP	1.5	0.40	ขาว
2263	281	PP	KP	PP	-	-	-
2264	282	KP	KP	KP	3.7	4.03	ดำ
2265	283	PP	KP	KP	1.7	0.55	ขาว
2266	284	PP	PP	KP	1.3	0.00	ขาว
2267	285	PP	KP	KP	1.6	0.34	ขาว
2268	286	PP	PP	KP	1.6	0.18	ขาว
2269	287	PP	KP	KP	1.4	0.38	ขาว
2270	288	KP	PP	KP	3.8	3.95	ดำ
2271	289	PP	KP	KP	1.8	0.00	ขาว
2272	290	PP	KP	PP	-	-	-
2273	291	KP	PP	PP	1.4	0.31	น้ำตาล
2274	292	KP	KP	PP	12.7	2.81	แดง
2275	293	KP	PP	KP	12.6	7.53	แดงดำ
2276	294	KP	KP	KP	12.8	6.34	แดงดำ
2277	295	KP	KP	KP	-	-	-
2278	296	KP	KP	KP	12.5	2.65	แดง
2279	297	KP	KP	KP	12.7	5.10	แดงดำ
2280	298	KP	KP	PP	11.4	4.60	แดงดำ
2281	299	KP	KP	KP	11.3	4.42	แดงดำ
2282	300	PP	PP	PP	1.5	0.00	ขาว
2283	133	PP	PP	PP	1.5	0.00	ขาว
2284	134	PP	PP	PP	0.9	0.00	ขาว
2285	135	PP	PP	PP	1.3	0.00	ขาว
2286	136	PP	PP	PP	1.4	0.00	ขาว
2287	137	PP	PP	PP	0.9	0.00	ขาว
2288	138	-	-	-	-	-	-
2289	139	PP	PP	PP	1.9	0.00	ขาว
2290	140	KP	PP	PP	5.6	7.14	ดำ
2291	141	PP	PP	PP	2.1	0.00	ขาว
2292	142	KP	PP	PP	3.5	3.93	ดำ
2293	143	KP	PP	PP	2.1	0.00	ขาว
2294	144	PP	PP	PP	2.3	0.00	ขาว
2295	145	PP	PP	KP	2.5	0.00	ขาว
2296	146	KP	PP	PP	3.8	4.11	ดำ
2297	147	PP	KP	PP	1.9	0.00	ขาว
2298	148	PP	KP	KP	1.8	0.62	ขาว
2299	149	KP	PP	KP	7.2	16.07	ดำ
2300	150	KP	PP	KP	5.3	12.99	ดำ

plot ที่	ต้นที่	RM17321 (<i>OsB1&B2</i>)	RM11383 (<i>OsDFR</i>)	RM15209 (<i>OsMYB3</i>)	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ	ปริมาณแอน โทไซยานิน	สีเหื่อหุ้ม เมล็ด
2301	A151	PP	PP	PP	2.1	0.50	ขาว
2302	A152	PP	KP	KP	2.0	-	ขาว
2303	A153	KP	PP	KP	3.4	3.16	ดำ
2304	A154	KP	PP	PP	3.3	2.41	น้ำตาล
2305	A155	KP	KP	PP	1.7	1.85	น้ำตาล
2306	A156	PP	KP	PP	-	-	-
2307	A157	PP	KP	KP	-	-	-
2308	A158	PP	PP	KP	-	-	ขาว
2309	A159	KP	KP	KP	-	-	-
2310	A160	PP	KP	KP	-	-	-
2311	A161	PP	PP	PP	-	-	-
2312	A162	PP	PP	KP	-	-	-
2313	J351	KP	PP	KP	-	-	ดำ
2314	J352	KP	PP	KP	2.7	-	ดำ
2315	J353	KP	KP	KP	3.8	-	ดำ
2316	J354	PP	PP	PP	-	-	-
2317	J355	PP	KP	KP	-	-	-
2318	J356	PP	KP	KP	-	-	-
2319	J357	KP	PP	KP	4.6	2.1	ดำ
2320	J358	PP	PP	PP	1.9	0.2	ขาว
2321	J310	PP	KP	KP	-	-	ขาว

ภาพผนวกที่ 13 จีโนไทป์และฟีโนไทป์ของประชากร BC₁F₁ จำนวน 318 ต้น



ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดเพิ่มเติม
โดยกำหนดให้ กลุ่มไม่มีสี ให้คะแนนเป็น 0 และกลุ่มมีสี ให้คะแนนเป็น 1

1. การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง กับสีเขียวหุ้มเมล็ด ด้วยวิธี ANOVA

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ สีเขียวหุ้มเมล็ด กำหนดให้เป็นแบบ มีสี และไม่มีสี จัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ด้วยวิธี Tukey ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 277 ต้น พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยสีเขียวหุ้มเมล็ดแตกต่างกัน ดังนั้นเครื่องหมาย RM17321 และ RM15209 จึงมีอิทธิพลกับสีเขียวหุ้มเมล็ด แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ไม่สามารถจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ได้ และไม่มีอิทธิพลกับสีเขียวหุ้มเมล็ด ได้ผลดังตารางผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ 1 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 1 เครื่องหมาย กับสีเขียวหุ้มเมล็ด ในประชากร BC_1F_1

เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	จีโนไทป์	จำนวนประชากร BC_1F_1	ฟีโนไทป์ สีเขียวหุ้มเมล็ดกรณีที่ 2			
			ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KP	146	0.966	a	0.812	0.000*
	PP	131	0.000	b	0.000	
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KP	107	0.551	a	0.500	0.265 ^{ns}
	PP	170	0.482	a	0.501	
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KP	125	0.576	a	0.496	0.043*
	PP	152	0.454	b	0.500	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, a, b คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1 อย่างละ 1 แถบ

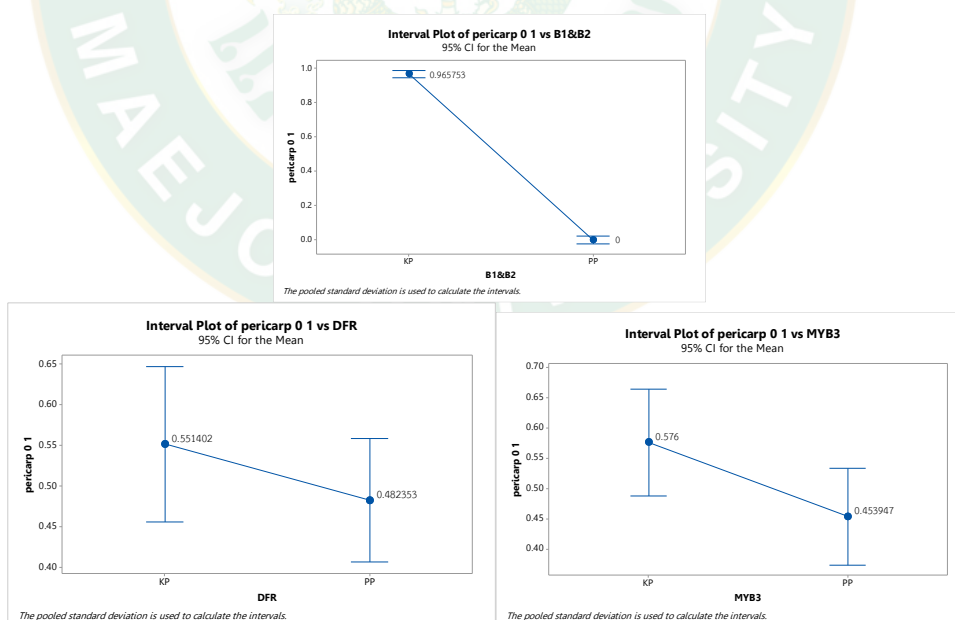
PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* กับสีเขียวหุ้มเมล็ด สามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจน 2 กลุ่ม ตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่ม a และ b ตามลำดับ ดังนั้น การวิเคราะห์อิทธิพลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ตามลำดับ ในประชากร BC_1F_1 กับค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ด คาดว่ามีอิทธิพลและความสำคัญต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ตามสภาพของจีโนไทป์

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้ตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a ดังนั้น การวิเคราะห์อิทธิพลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด คาดว่าไม่มีอิทธิพลต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด ไม่สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ตามสภาพของจีโนไทป์

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ดังนี้ จีโนไทป์แบบ KP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a และจีโนไทป์แบบ PP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม b ดังนั้น การวิเคราะห์อิทธิพลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ในประชากร BC_1F_1 กับค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ด คาดว่ามีอิทธิพลและความสำคัญต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพผนวกที่ 14)



ภาพผนวกที่ 14 ค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ดกรณี 2 ของจีโนไทป์แบบ KP และ PP ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC_1F_1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2. การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนร่วมกัน 2 ตำแหน่ง กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ด้วยวิธี ANOVA

จากการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ ข้อ 8.3.4 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* ไม่สัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ 2 เครื่องหมายร่วมกัน คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 กับฟีโนไทป์ คือสีเยื่อหุ้มเมล็ด และจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ ด้วยวิธี Tukey ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 277 ต้น พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมุติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ด แตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่ายีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* มีอิทธิพลกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ได้ผลดังตารางผนวกที่ 2

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร BC_1F_1

จีโนไทป์ RM17321 ร่วมกับ RM15209	จำนวนประชากร BC_1F_1	ฟีโนไทป์ สีเยื่อหุ้มเมล็ด			
		ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
KPKP	75	0.960	a	0.197	0.000*
KPPP	71	0.972	a	0.167	
PPKP	50	0.000	b	0.000	
PPPP	81	0.000	b	0.000	

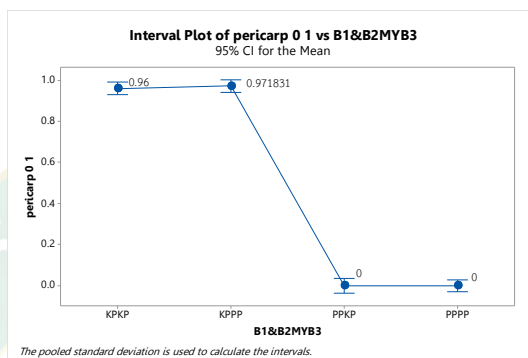
หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, a, b คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1 อย่างละ 1 แถบ

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจน 2 กลุ่ม ตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ กลุ่ม 1 (a) มีจีโนไทป์แบบ KPKP และ KPPP และกลุ่ม 2 (b) มีจีโนไทป์แบบ PPKP และ PPPP ดังนั้น การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด คาดว่ามีอิทธิพลและความสำคัญในการคัดเลือก

ต้นข้าวที่สัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยแยกกลุ่มตามจีโนไทป์ได้ชัดเจนจำนวน 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ที่มีจีโนไทป์แบบ KP__ จัดอยู่กลุ่ม a และกลุ่ม 2 ที่มีจีโนไทป์แบบ PP__ จัดให้อยู่กลุ่ม b แสดงว่า การไม่มีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 จะมีอิทธิพลต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด จัดอยู่กลุ่ม 2 (b) แต่ถ้ามีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 จะมีอิทธิพลต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด จัดอยู่กลุ่ม 1 (a) (ภาพผนวกที่ 15)



ภาพผนวกที่ 15 ค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ดของจีโนไทป์จำนวน 4 แบบ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC₁F₁ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

3. การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับสีเยื่อหุ้มเมล็ดด้วยวิธี Pearson correlation

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดกรณีที่ 2 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีระดับความสัมพันธ์สูงมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ค่า *r* เท่ากับ 0.964 และ *p*-value 0.000 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีระดับความสัมพันธ์ต่ำมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ค่า *r* เท่ากับ 0.121 และ *p*-value 0.043 และมีทิศทางในเชิงบวก ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ค่า *r* เท่ากับ 0.067 และ *p*-value 0.265



ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ถดถอยในประชากร F_2 และ BC_1F_1

(อธิบายสมการถดถอย)

1. ประชากร F_2

การวิเคราะห์ถดถอยระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ประกอบด้วย การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย (simple regression) และการวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ (multiple regression) ดังนี้

1.1 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี simple regression

การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า

เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีสมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α และ β เท่ากับ 0.1322 และ 0.2613 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM17321 (x) มีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ที่ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้น 0.2613 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 0.531 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ 41.30 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีสมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α และ β เท่ากับ 2.787 และ 0.604 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM15209 (x) มีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ที่ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้น 0.604 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 1.650 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ 6.22 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม

จากการวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่สามารถอธิบายความผันแปรของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.86 และค่า p-value เท่ากับ 0.110 คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 3)

1.2 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี multiple regression

จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย ข้อ 6.3.1 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้สมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α , β_1 และ β_2 เท่ากับ 1.249, 1.564 และ 0.560 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายทั้ง 2 ตำแหน่งเหมือนพันธุ์รับปฐมธานี 1 (Homozygous Pathum Thani 1) จะมีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) ประมาณ 1.249 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (x_2) คงที่ เมื่อมีอัลลีลจากพันธุ์ให้กำเนิดของเครื่องหมาย RM17321 (x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้นประมาณ 1.564 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ในทางตรงกันข้ามเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (x_1) คงที่ เมื่อมีอัลลีลจากพันธุ์ให้กำเนิดของเครื่องหมาย RM15209 (x_2) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้นประมาณ 0.560 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) 1.246 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้งและสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของของค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) ได้ 46.64 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) (ตารางผนวกที่ 4)

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของประชากร F_2

จีโนไทป์ เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ ยีน	ฟีโนไทป์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		R^2 (เปอร์เซ็นต์)	p-value
	สัมประสิทธิ์การถดถอย ($y = \alpha + \beta x$)	SE		
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	$\alpha=0.1322, \beta=0.2613$	0.531	41.30	0.000*
RM11383/ <i>OsDFR</i>	$\alpha=3.123, \beta=0.2284$	1.696	0.86	0.110 ^{ns}
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	$\alpha=2.787, \beta=0.604$	1.650	6.22	0.000*

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, y = ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, x = เครื่องหมายดีเอ็นเอ, SE = standard error

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2

จีโนไทป์	ฟีโนไทป์		R ² (เปอร์เซ็นต์)	p-value
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ			
	สัมประสิทธิ์การถดถอย (y = α + βx ₁ + βx ₂)	SE		
เครื่องหมายดีเอ็นเอ				
RM17321 ร่วมกับ RM15209	α=1.249, β ₁ =1.564, β ₂ =0.560	1.246	46.64	0.000*

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, y = ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, x_1 = เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, x_2 = เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209, SE = standard error

2. ประชากร BC_1F_1

การวิเคราะห์ถดถอยระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับ ฟีโนไทป์ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ปริมาณแอนโทไซยานิน ประกอบด้วย การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย (simple regression) และการวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ (multiple regression) ดังนี้

2.1 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ด้วยวิธี simple regression

การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC_1F_1 จำนวน 266 ต้น พบว่า

เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีสมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α และ β เท่ากับ 1.557 และ 3.122 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM17321 (x) มีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ที่ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้น 3.122 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 2.352 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ 30.59 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีสมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α และ β เท่ากับ 2.639 และ 1.358 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM15209 (x) มีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยเพิ่มขึ้น 1

อัลลีล ที่ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้น 1.358 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 2.740 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ 5.76 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่สามารถอธิบายความผันแปรของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 1.27 และค่า p-value เท่ากับ 0.067 คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 5)

2.2 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี multiple regression

จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย ข้อ 2.1 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น จึงวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้สมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α , β_1 และ β_2 เท่ากับ 1.216, 2.988 และ 0.923 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายทั้ง 2 ตำแหน่งเหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1 (Homozygous Pathum Thani 1) จะมีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) ประมาณ 1.216 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (x_2) คงที่ เมื่อมีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยของเครื่องหมาย RM17321 (x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้นประมาณ 2.988 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ในทางตรงกันข้ามเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (x_1) คงที่ เมื่อมีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยของเครื่องหมาย RM15209 (x_2) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้นประมาณ 0.923 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) 2.312 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้งและสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของของค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) ได้ 32.69 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) (ตารางผนวกที่ 6)

2.3 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี simple regression

การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร BC₁F₁ จำนวน 250 ต้น พบว่า

เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 กับปริมาณแอนโทไซยานิน มีสมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α และ β เท่ากับ 0.101 และ 6.161 ไมโครโมล/กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM17321 (x) มีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ที่ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานิน (y) เพิ่มขึ้น 6.161 ไมโครโมล/กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 3.674 ไมโครโมล/กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของปริมาณแอนโทไซยานินได้ 41.29 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 กับปริมาณแอนโทไซยานิน มีสมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α และ β เท่ากับ 2.278 และ 2.601 ไมโครโมล/กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM15209 (x) มีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ที่ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานิน (y) เพิ่มขึ้น 2.601 ไมโครโมล/กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 4.615 ไมโครโมล/กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของปริมาณแอนโทไซยานินได้ 7.35 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน และเมื่อวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่สามารถอธิบายความผันแปรของปริมาณแอนโทไซยานินได้ เนื่องจาก ค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า p-value เท่ากับ 0.983 คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 7)

2.4 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี multiple regression

จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย ข้อ 8.1.4 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น จึงวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน ได้สมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α , β_1 และ β_2 เท่ากับ 0.572, 5.916 และ 1.786 ไมโครโมล/กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ ถ้าจีโนไทป์

ของเครื่องหมายทั้ง 2 ตำแหน่งเหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1 (Homozygous Pathum Thani 1) จะมีค่าปริมาณแอนโทไซยานิน (y) ประมาณ 0.572 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (x_2) คงที่ เมื่อมีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยของเครื่องหมาย RM17321 (x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ค่าปริมาณแอนโทไซยานิน (y) เพิ่มขึ้นประมาณ 5.916 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ในทางตรงกันข้ามเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (x_1) คงที่ เมื่อมีอัลลีลจากพันธุ์ให้ก้าน้อยของเครื่องหมาย RM15209 (x_2) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ค่าปริมาณแอนโทไซยานิน (y) เพิ่มขึ้นประมาณ 1.786 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) 3.573 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของของค่าปริมาณแอนโทไซยานิน (y) ได้ 44.69 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) (ตารางผนวกที่ 8)

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC_1F_1

จีโนไทป์	ฟีโนไทป์		R ² (เปอร์เซ็นต์)	p-value
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ			
เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ ยีน	สัมประสิทธิ์การถดถอย (y = α + βx)	SE		
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	α=1.557, β=3.122	2.352	30.59	0.000*
RM11383/ <i>OsDFR</i>	α=2.997, β=0.651	2.805	1.27	0.067 ^{ns}
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	α=2.639, β=1.358	2.740	5.76	0.000*

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, y = ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, x = จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ, SE = standard error

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC₁F₁

จีโนไทป์	ฟีโนไทป์		R ² (เปอร์เซ็นต์)	p-value
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	SE		
เครื่องหมายดีเอ็นเอ	สัมประสิทธิ์การถดถอย ($y = \alpha + \beta x_1 + \beta x_2$)			
เอ				
RM17321 ร่วมกับ RM15209	$\alpha=1.216,$ $\beta_1=2.988, \beta_2=0.923$	2.312	32.69	0.000*

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, y = ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, x_1 = จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, x_2 = จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209, SE = standard error

ตารางผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับ ปริมาณแอนโทไซยานินของประชากร BC₁F₁

จีโนไทป์	ฟีโนไทป์		R ² (เปอร์เซ็นต์)	p-value
	ปริมาณแอนโทไซยานิน	SE		
เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ ยีน	สัมประสิทธิ์การถดถอย ($y = \alpha + \beta x$)			
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	$\alpha=0.101, \beta=6.161$	3.674	41.29	0.000*
RM11383/ <i>OsDFR</i>	$\alpha=3.448, \beta=0.013$	4.795	0.00	0.983 ^{ns}
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	$\alpha=2.278, \beta=2.601$	4.615	7.35	0.000*

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, y = ปริมาณแอนโทไซยานิน, x = จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ, SE = standard error

ตารางผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากร BC₁F₁

จีโนไทป์	ฟีโนไทป์		R ² (เปอร์เซ็นต์)	p-value
	ปริมาณแอนโทไซยานิน			
เครื่องหมายดีเอ็นเอ	สัมประสิทธิ์การถดถอย ($y = \alpha + \beta x_1 + \beta x_2$)	SE		
RM17321 ร่วมกับ RM15209	$\alpha = -0.572$, $\beta_1 = 5.916$, $\beta_2 = 1.786$	3.573	44.69	0.000*

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, y = ปริมาณแอนโทไซยานิน, x_1 = จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, x_2 = จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209, SE = standard error



ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์เพิ่มเติมในประชากร BC_1F_1
(โดยไม่นำต้นที่มียีน Rc ที่ทำงานได้มาวิเคราะห์)

1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ANOVA

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร BC₁F₁ จำนวน 247 ต้น แบ่งออกเป็น การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง จัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์โดยใช้วิธี Tukey พบว่า เครื่องหมาย RM17321 และ RM15209 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H₁ คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ดังนั้นเครื่องหมาย RM17321 และ RM15209 จึงมีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ไม่สามารถจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ได้ และไม่มีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังตารางผนวกที่ 9

ตารางผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	จีโนไทป์	จำนวนประชากร F ₂	ฟีโนไทป์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ			
			ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KP	125	3.600	a	1.482	0.000*
	PP	125	1.557	b	0.721	
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KP	90	2.567	a	1.438	0.853 ^{ns}
	PP	157	2.605	a	1.619	
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KP	107	3.100	a	1.795	0.000*
	PP	140	2.202	b	1.208	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

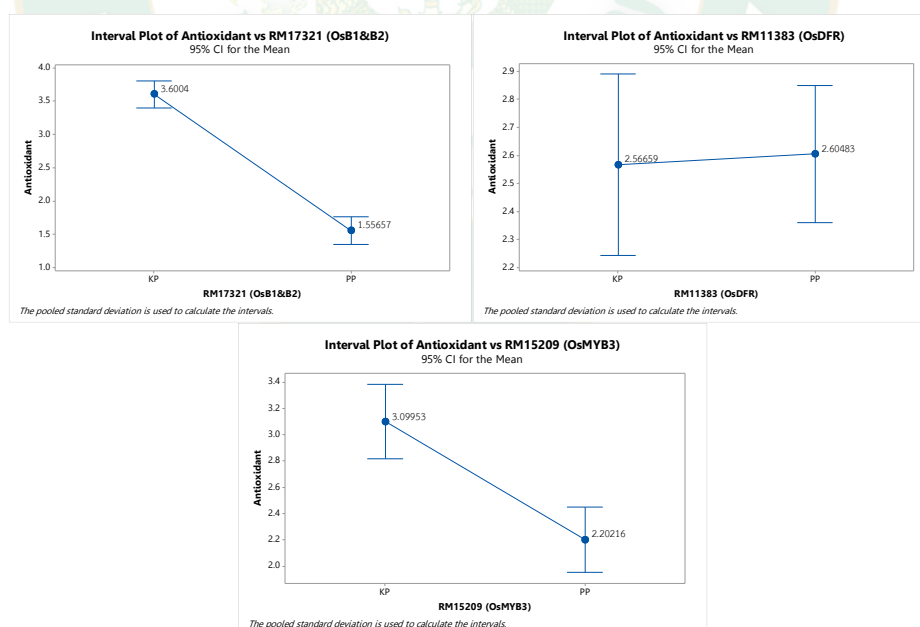
KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่ม a และ b ตามลำดับ ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพผนวกที่ 16)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้ตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกัน คือ กลุ่ม a ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีอิทธิพลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพผนวกที่ 16)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsMYB3* กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่ม a และ b ตามลำดับ คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพผนวกที่ 16)



ภาพผนวกที่ 16 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์แบบ KP และ PP ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC_1F_1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.2 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนร่วมกัน 2 ตำแหน่ง กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ANOVA

จากการวิเคราะห์หาอิทธิพลความสัมพันธ์ ข้อ 1.1 พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น จึงได้ทำการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ 2 เครื่องหมายร่วมกัน คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 247 ต้น และจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ด้วยวิธี Turkey พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 แบบ ที่มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่ายีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* มีอิทธิพลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังตารางผนวกที่ 10

ตารางผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC_1F_1

จีโนไทป์	จำนวน	ฟีโนไทป์			
RM17321 ร่วมกับ	ประชากร	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ			
RM15209	F_2	ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
KPKP	62	4.199	a	1.505	0.000*
KPPP	63	3.011	b	1.206	
PPKP	45	1.584	c	0.754	
PPPP	77	1.540	c	0.701	

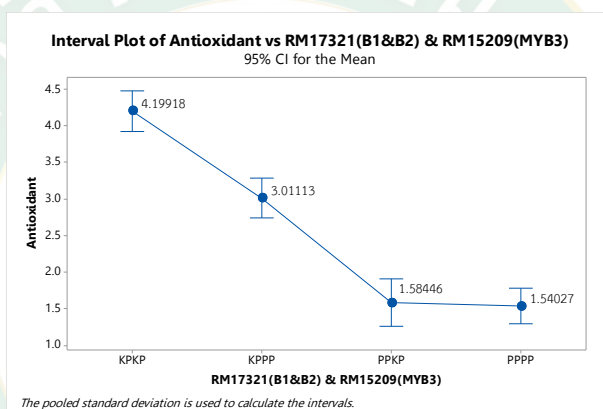
หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b, c คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งกลุ่มได้ จำนวน 3 กลุ่ม ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ ด้วยความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ได้แก่ กลุ่ม 1 (a) มีจีโนไทป์แบบ KPKP กลุ่ม 2 (b) มีจีโนไทป์แบบ KPPP และกลุ่ม 3 (c) มีจีโนไทป์แบบ PPKP และ PPPP ดังนั้น

คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีอิทธิพลและความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าวที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยแยกกลุ่มตามจีโนไทป์ได้ชัดเจนจำนวน 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ที่มีจีโนไทป์แบบ KPKP จัดอยู่กลุ่ม a กลุ่ม 2 ที่มีจีโนไทป์แบบ KPPP จัดให้อยู่กลุ่ม b และกลุ่ม 3 ที่มีจีโนไทป์แบบ PP__ จัดให้อยู่ในกลุ่ม c แสดงว่า การไม่มีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ จัดอยู่กลุ่ม 3 (c) แต่ถ้ามีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 อย่างน้อย 1 อัลลีล จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น จัดอยู่กลุ่ม 2 (b) นอกจากนี้ การมีอัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ อัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 จะมีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยจัดอยู่กลุ่ม 1 (a) (ภาพผนวกที่ 17)



ภาพผนวกที่ 17 ค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของจีโนไทป์จำนวน 4 แบบ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC₁F₁ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

1.3 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Pearson correlation

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีระดับความสัมพันธ์สูง ค่า r เท่ากับ 0.659 และ p-value 0.000 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีระดับความสัมพันธ์ต่ำ ค่า r เท่ากับ 0.287 และ p-value 0.000 และมีทิศทางในเชิงบวก ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ค่า r เท่ากับ -0.012 และ p-value 0.853

1.4 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Simple regression

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของประชากร BC₁F₁ จำนวน 247 ต้น ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีนอลไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีถดถอยอย่างง่าย เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R²) พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R² เท่ากับ 43.47 และ 8.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ns) โดยมีค่า R² เท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 11)

ตารางผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R ² (เปอร์เซ็นต์)	p-value
RM17321	<i>OsB1&B2</i>	4	43.47	0.000*
RM11383	<i>OsDFR</i>	1	0.01	0.853 ^{ns}
RM15209	<i>OsMYB3</i>	3	8.23	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

1.5 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Multiple regression

จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย ข้อ 9.1.4 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R²) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R² สูงขึ้น เท่ากับ 47.63 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 12)

ตารางผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยืติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R ² (เปอร์เซ็นต์)	p-value
RM17321 ร่วมกับ RM15209	<i>OsB1&B2</i> <i>OsMYB3</i>	4 3	47.63	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

2. ปริมาณแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์ห่อหุ้มผลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี ANOVA แบ่งออกเป็นวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยืติดกับยีน 1 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง ดังนี้

2.1 การวิเคราะห์ห่อหุ้มผลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยืติดกับยีน 1 ตำแหน่ง กับปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี ANOVA

การวิเคราะห์ห่อหุ้มผลความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยืติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน ในประชากร BC₁F₁ จำนวน 231 ต้น จัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ ด้วยวิธี Tukey พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินแตกต่างกัน ดังนั้นเครื่องหมาย RM17321 และ RM15209 จึงมีอิทธิพลกับปริมาณแอนโทไซยานิน แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ไม่สามารถจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ได้ และไม่มีอิทธิพลกับปริมาณแอนโทไซยานิน ได้ผลดังตารางผนวกที่ 13

ตารางผนวกที่ 13 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 1 เครื่องหมาย กับ ปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมาย/ ยีน	จีโนไทป์	จำนวน ประชากร F ₂	ฟีโนไทป์ ปริมาณแอนโทไซยานิน			
			ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KP	117	5.210	a	5.210	0.000*
	PP	114	0.101	b	0.221	
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KP	87	3.333	a	4.614	0.914 ^{ns}
	PP	144	3.405	a	5.113	
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KP	101	4.850	a	6.011	0.000*
	PP	130	2.234	b	3.486	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b, c คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1 อย่างละ 1 แถบ

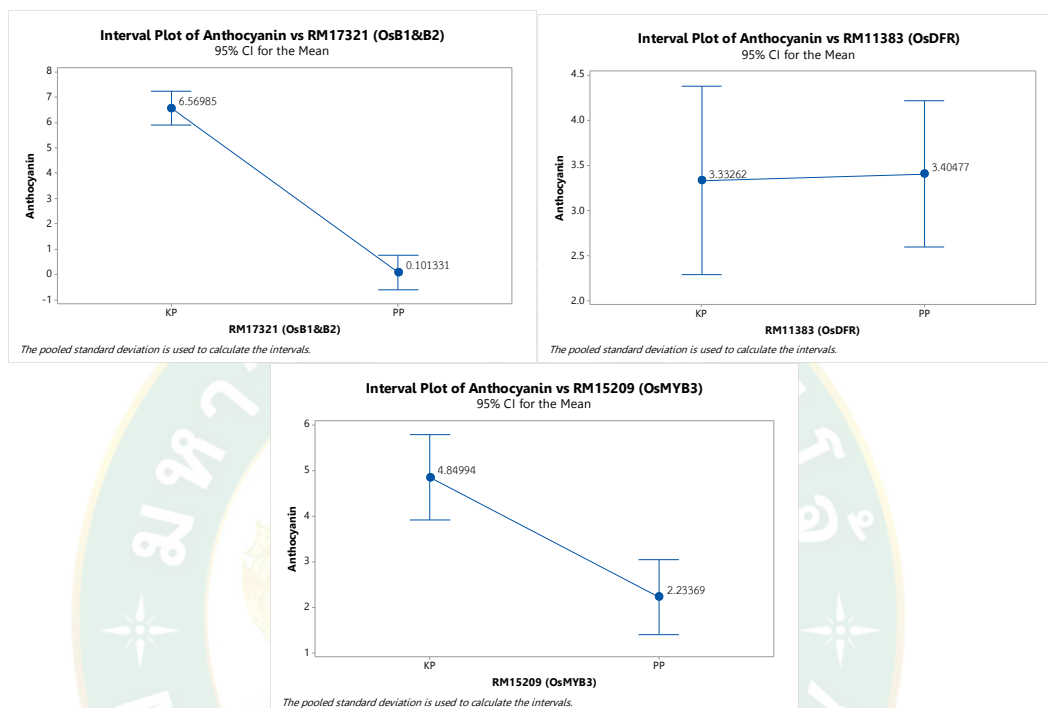
PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* กับปริมาณแอนโทไซยานินสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจน 2 กลุ่ม ตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ดังนี้ จีโนไทป์แบบ KP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a และจีโนไทป์แบบ PP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม b ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อปริมาณแอนโทไซยานิน สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพผนวกที่ 16)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้ตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ดังนี้ จีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณแอนโทไซยานิน ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพผนวกที่ 16)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3* กับปริมาณแอนโทไซยานินสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ดังนี้ จีโนไทป์แบบ KP จำนวน ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a และจีโนไทป์แบบ PP จัดอยู่ในกลุ่ม b

ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อปริมาณแอนโทไซยานิน สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพผนวกที่ 18)



ภาพผนวกที่ 18 ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของจีโนไทป์แบบ KP และ PP ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC_1F_1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.2 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีนร่วมกัน 2 ตำแหน่ง กับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี ANOVA

จากการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ ข้อ 2.1 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ 2 เครื่องหมายร่วมกัน คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน ในประชากร BC_1F_1 จำนวน 231 ต้น และจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ด้วยวิธี Tukey พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมุติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่าง

น้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินแตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่า *OsB1&B2* และ *OsMYB3* มีอิทธิพลกับปริมาณแอนโทไซยานิน ได้ผลดังตารางผนวกที่ 14

ตารางผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน ในประชากร BC₁F₁

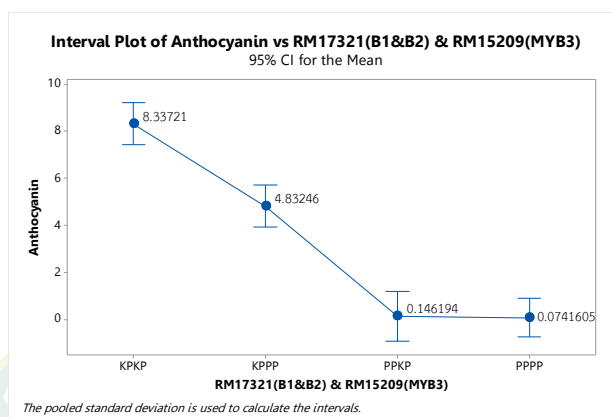
จีโนไทป์ RM17321 ร่วมกับ RM15209	จำนวน ประชากร F ₂	ฟีโนไทป์ ปริมาณแอนโทไซยานิน			
		ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
KPKP	58	8.337	a	5.853	0.000*
KPPP	59	4.832	b	3.797	
PPKP	43	0.146	c	0.279	
PPPP	71	0.074	c	0.173	

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b, c คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับพุ่มธานี 1 อย่างละ 1 แถบ
PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับพุ่มธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานินสามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนตามสภาพของจีโนไทป์ จำนวน 3 กลุ่ม ด้วยความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ได้แก่ กลุ่ม 1 (a) มีจีโนไทป์แบบ KPKP ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด กลุ่ม 2 (b) มีจีโนไทป์แบบ KPPP ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินสูงรองลงมา และกลุ่ม 3 (c) จีโนไทป์แบบ PPKP และ PPPP ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินต่ำที่สุด

ดังนั้น การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 กับปริมาณแอนโทไซยานิน คาดว่ามีอิทธิพลและความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าวที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน โดยแยกกลุ่มตามจีโนไทป์ได้ชัดเจน จำนวน 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 (a) KPKP กลุ่ม 2 (b) KPPP และ กลุ่ม 3 (c) PP__ แสดงว่าการไม่มีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินต่ำ แต่ถ้ามีอัลลีล K ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 อย่างน้อย 1 อัลลีล จะมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงขึ้น นอกจากนี้ การมีอัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล

ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ อัลลีล K อย่างน้อย 1 อัลลีล ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 จะทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด (ภาพผนวกที่ 19)



ภาพผนวกที่ 19 ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของจีโนไทป์จำนวน 4 แบบ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC₁F₁ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2.3 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี Pearson correlation

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีระดับความสัมพันธ์ปานกลาง ค่า *r* เท่ากับ 0.659 และ *p*-value 0.000 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีระดับความสัมพันธ์ต่ำ ค่า *r* เท่ากับ 0.264 และ *p*-value 0.000 และมีทิศทางในเชิงบวกทั้ง 2 เครื่องหมาย ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ค่า *r* เท่ากับ -0.007 และ *p*-value 0.914

2.4 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี Simple regression

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของประชากร BC₁F₁ จำนวน 231 ต้น ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีนอล คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี

ถดถอยอย่างง่าย เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 43.38 และ 6.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ns) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 15)

ตารางผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับ ปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R^2 (เปอร์เซ็นต์)	p-value
RM17321	<i>OsB1&B2</i>	4	43.38	0.000*
RM11383	<i>OsDFR</i>	1	0.01	0.914 ^{ns}
RM15209	<i>OsMYB3</i>	3	6.98	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

2.5 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานิน

ด้วยวิธี Multiple regression

จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย ข้อ 9.2.4 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ดังนั้นจึงวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 46.87 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 16)

ตารางผนวกที่ 16 การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ยีน	โครโมโซม	R ² (เปอร์เซ็นต์)	p-value
RM17321 ร่วมกับ RM15209	<i>OsB1&B2</i> <i>OsMYB3</i>	4 3	46.87	0.000*

หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

3. สีเยื่อหุ้มเมล็ด

สำหรับการวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ด กำหนดสีเยื่อหุ้มเมล็ดออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 สีขาว ให้คะแนนเป็น 0 แบบที่ 2 สีน้ำตาลถึงดำ ให้คะแนนเป็น 1

3.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยัดติดกับยีน 1 ตำแหน่ง กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ด้วยวิธี ANOVA

การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ สีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC₁F₁ จำนวน 258 ต้น และจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ด้วยวิธี Tukey พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ดแตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่ายีน *OsB1&B2* มีอิทธิพลกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 และ RM15209 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ไม่สามารถจัดกลุ่มตามสภาพจีโนไทป์ได้ และไม่มีอิทธิพลกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ได้ผลดังตารางผนวกที่ 17

ตารางผนวกที่ 17 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 1 เครื่องหมาย กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร BC₁F₁

เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	จีโนไทป์	จำนวนประชากร BC ₁ F ₁	ฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ด			
			ค่าเฉลี่ย	กลุ่ม	SD	p-value
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KP	127	0.961	a	0.195	0.000*
	PP	131	0.000	b	0.000	
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KP	95	0.495	a	0.503	0.593 ^{ns}
	PP	163	0.460	a	0.499	
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KP	113	0.531	a	0.501	0.100 ^{ns}
	PP	145	0.428	a	0.496	

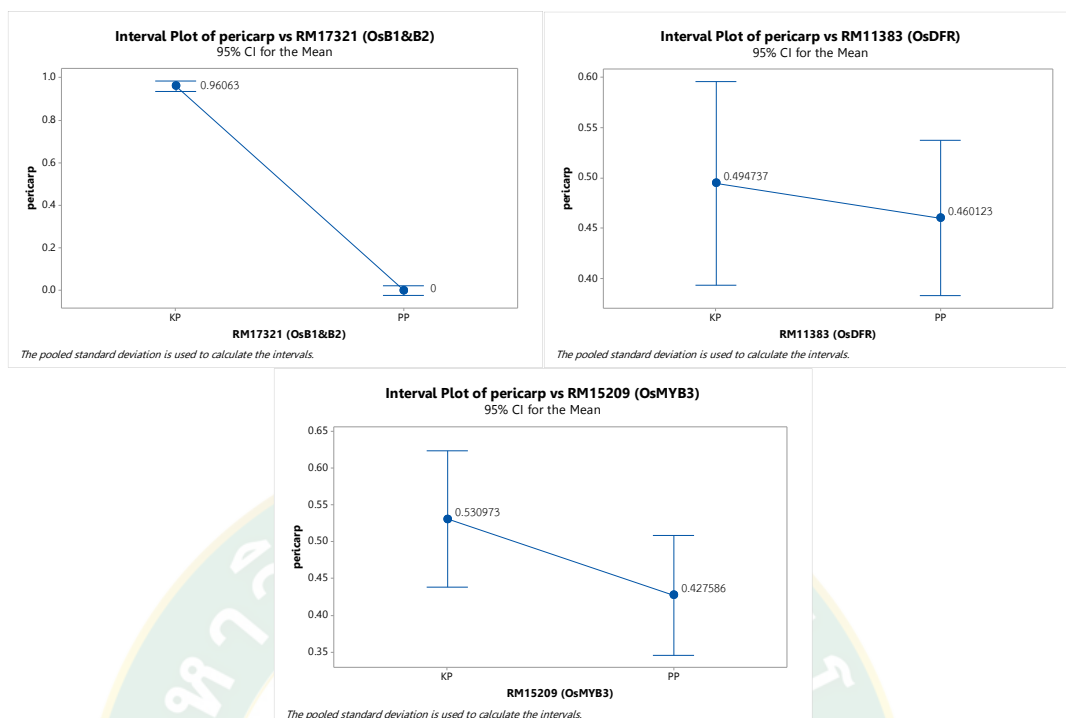
หมายเหตุ * คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์, a, b คือ กลุ่มของค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

KP คือ จีโนไทป์แบบ heterozygous เหมือนพันธุ์ให้ก้าน้อย และพันธุ์รับปทุมธานี 1 อย่างละ 1 แถบ

PP คือ จีโนไทป์แบบ homozygous ที่เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจน 2 กลุ่ม ตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่กลุ่ม a และ b ตามลำดับ ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีอิทธิพลและความสำคัญต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพผนวกที่ 20)

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้ตามสภาพของจีโนไทป์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยจีโนไทป์แบบ KP และ PP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม a ดังนั้น คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 และ RM15209 ไม่มีอิทธิพลต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ตามสภาพของจีโนไทป์ (ภาพผนวกที่ 20)



ภาพผนวกที่ 20 ค่าเฉลี่ยสีเยื่อหุ้มเมล็ดของจีโนไทป์แบบ KP และ PP ของเครื่องหมาย ดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ในประชากร BC_1F_1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3 การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ด้วยวิธี Pearson correlation

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีระดับความสัมพันธ์สูงมากกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ค่า r เท่ากับ 0.962 และ p -value 0.000 ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 และ RM15209 ไม่มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ค่า r เท่ากับ 0.033 และ 0.103 ตามลำดับ และ p -value มากกว่า 0.05

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล

นางสาวธัญพรธน์ ทอง

เกิดเมื่อ

29 มิถุนายน 2535

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2557 ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2553 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพญาลอวิทยาคม จังหวัดพะเยา

พ.ศ. 2550 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนดอกคำใต้วิทยาคม จังหวัดพะเยา

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2556 ฝึกประสบการณ์วิชาชีพ ปฏิบัติงานสังกัดหน่วยวิเคราะห์ แผนก
วิทยาศาสตร์ ส่วนผลิต บริษัท ธนภักดี จำกัด จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2557 ตำแหน่งพนักงานฝ่ายผลิต บริษัท เบลตัน อินดัสเทรียล
(ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดปทุมธานี

พ.ศ. 2557-2558 ตำแหน่งเจ้าหน้าที่วิเคราะห์นโยบายและแผน สังกัด
สำนักงานพลังงาน จังหวัดพะเยา

พ.ศ. 2558-2559 ตำแหน่งพนักงานนำเข้าข้อมูล บริษัท สเกลจีโอเทค จำกัด
ปฏิบัติงานที่ สำนักงานที่ดิน จังหวัดชุมพร

พ.ศ. 2559-2561 ตำแหน่งพนักงานขาย บริษัท เซ็นทรัลเทรดดิ้ง จำกัด
ปฏิบัติงาน ภาคเหนือตอนบน