หัวข้อวิทยานิพนธ์	การควบคุมทางพันธุกรรมของปริมาณแอนโทไซยานิน ในข้าวเหนียวก่ำ
ผู้เขียน	นายพีรนันท์ มาปัน
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) พืชไร่
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ. ดร. ศันสนีย์ จำจด อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อ. ดร. ชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ข้าวก่ำหรือข้าวเหนียวดำเป็นพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไวต่อช่วงแสง ปลูกได้แค่ปีละครั้ง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวก่ำให้เป็นพันธุ์ที่ไม่ไวต่อช่วงแสง เพื่อสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี รวมทั้งมีปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดสูง จึงเป็นลักษณะที่ต้องการ การเข้าใจในการถ่ายทอดพันธุกรรมของปริมาณแอนโทไซยานินจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อนำไปเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะการสะสมปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดในลูกผสมชั่วที่ 1 จนถึงชั่วที่ 3 รวมทั้งเพื่อคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะแอนโทไซยานินในเมล็ดสูงและไม่ไวต่อช่วงแสงในชั่วต้นๆ โดยทดลองที่สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือน มิถุนายน พ.ศ. 2554 ถึง มิถุนายน พ.ศ. 2556

การทดลองที่ 1 ประเมินลักษณะสัณฐานของลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างข้าวก่ำดอยสะเก็ดกับข้าวขาว 4 พันธุ์เทียบกับพันธุ์พ่อแม่โดยเริ่มจากผสมพันธุ์ระหว่างข้าวเหนียวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดและข้าวขาว 4 พันธุ์และคู่ผสมสลับพ่อแม่ จำนวน 8 คู่ผสม ปลูกลูกผสมเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีการแสดงออกของยีนเป็นแบบข่มโดยแสดงออกตั้งแต่ข่มไม่สมบูรณ์ไปจนถึงข่มสมบูรณ์ พบความแตกต่างระหว่างคู่ผสมในลักษณะสีเปลือกเมล็ดและสีเยื่อหุ้มเมล็ด แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างคู่ผสมกลับสลับพ่อแม่ ส่วนปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่าลูกผสมชั่วแรกมีค่าปริมาณแอนโทไซยานินน้อยมากเมื่อเทียบกับพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด

การทดลองที่ 2 ศึกษาการกระจายตัวทางพันธุกรรมของลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่างข้าวก่ำดอยสะเก็ดและปทุมธานี 1 ปลูกลูกผสมชั่วที่ 2 ในฤดูนาปรัง ปลูกทดลอง 2 ชุด ชุดแรกปลูกในกระถางพลาสติกบรรจุดิน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ปลูกจำนวน 1 ต้นต่อหลุม จำนวน 10 ต้นต่อกระถาง จำนวน 300 ต้น บันทึกลักษณะทางสัณฐาน คือ สีแผ่นใบ สีกาบใบ สีหูใบ สีเขี้ยวใบ สีปล้อง สียอดเกสรตัวเมีย การมีหางที่เมล็ด ขณะที่ชุดที่ 2 ปลูกลูกผสมชั่วที่ 2 ในแปลงทดลองจำนวน 600 ต้น ปลูกโดยวิธีปักดำ ใช้ระยะปลูก 25 x 25 เซนติเมตร จากนั้นคัดเลือกต้นไม่ไวแสงได้จำนวน 298 ต้น สุ่มบันทึกสีเยื่อหุ้มเมล็ดจำนวน 10 เมล็ดต่อต้น จากนั้นทดสอบการติดสีสารละลายไอโอดีนจาก 10 เมล็ดนั้น อีกส่วนนำเมล็ดไปแกะเปลือกออกด้วยมือ และนำข้าวกล้อง 2.5 กรัม วิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว พบว่าลักษณะทางสัณฐานถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 2-3 คู่ และมีการแสดงออกของยีนเป็นทั้งแบบข่มสมบูรณ์ และข่มข้ามคู่ โดยลักษณะสีแผ่นใบ สีกาบใบ สีลิ้นใบ สีเขี้ยวใบ สีปล้อง สีเกสรตัวเมียและการมีหางและไม่มีหางนั้นพบว่าถูกควบคุมโดยยีน 2 คู่ ส่วนลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดพบว่าถูกควบคุมโดยยีนจำนวน 3 คู่ ขณะที่การกระจายตัวของลักษณะปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่ามีการกระจายตัวเป็นแบบต่อเนื่อง อยู่ในช่วงของพันธุ์พ่อแม่ แต่ลูกผสมส่วนใหญ่จะมีค่าแอนโทไซยานินต่ำกระจายตัวไปในทิศทางของพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ไม่มีแอนโทไซยานิน ต้นที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงมีในสัดส่วนน้อยมาก จึงคาดว่ามีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเชิงปริมาณ ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมากคู่ จากนั้นศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในระดับสีเยื่อหุ้มเมล็ดในระดับสีต่างๆ ซึ่งได้แบ่งสีเยื่อหุ้มเมล็ดตามความเข้มของสีภายในกลุ่มเมล็ดที่มีสีม่วงและน้ำตาลออกเป็นสีละ 4 ระดับ คือ 3/4 ของเมล็ด, 2/4 ของเมล็ด, 1/4 ของเมล็ดและน้อยกว่า 1/4 ของเมล็ด พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินมีค่าเฉลี่ยรวมเพิ่มตามความเข้มสีเมล็ด ต้นที่มีแอนโทไซยานินสูงส่วนใหญ่มีเยื่อหุ้มเมล็ดตั้งแต่สีม่วงมากกว่าครึ่งเมล็ด ขณะที่ต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงต่ำกว่าครึ่งเมล็ดมีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับหรือใกล้เคียงกันกับต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล โดยที่ระดับสีม่วงเข้มสูงสุด (3/4 ของเมล็ด) และที่ระดับสีม่วงเข้มรองลงมา (2/4 ของเมล็ด) มีเพียงระดับสีละ 1 ต้นเท่านั้นที่มีค่าแอนโทไซยานินสูงเท่ากับพันธุ์แม่ก่ำดอยสะเก็ด ทั้งนี้ยังพบว่าต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มในระดับสูงที่สุดสามารถพบได้ทั้งในต้นที่ไม่มีแอนโทไซยานินเลย มีแอนโทไซยานินบ้างเล็กน้อยไปจนถึงมีค่าแอนโทไซยานินสูง ขณะที่ชนิดแป้งพบว่ามีการกระจายตัวทั้งชนิดข้าวเจ้า ข้าวเหนียว และ

ทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียวภายในต้นเดียวกันซึ่งกระจายตัวแบบข่มไม่สมบูรณ์ โดยพบชนิดข้าวเจ้ามากที่สุด และยังพบว่าลูกผสมทั้งชนิดข้าวเจ้า ข้าวเหนียว และเหนียวภายในต้นเดียวกัน ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงนั้นมีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินสูงอีกด้วย ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของข้าวทั้งชนิดข้าวเจ้าและชนิดข้าวเหนียวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงต่อไปได้

การทดลองที่ 3 คัดเลือกเฉพาะต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงหรือสีน้ำตาลมาปลูกทดสอบรุ่นลูกในชั่วที่ 3 ในฤดูนาปี จำนวน 137 families ปลูกแบบต้นต่อแถวและเก็บเกี่ยวเมล็ดรวมทั้งแถวหรือ family พบว่า การกระทำของยีนในลักษณะสีแผ่นใบ สีกาบใบ และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ให้ผลเช่นเดียวกันกับลูกผสมชั่วที่ 2 ในส่วนของลักษณะปริมาณแอนโทไซยานินนั้นพบว่าให้ผลยืนยันลูกผสมชั่วที่ 2 เช่นเดียวกันโดยมีการกระจายตัวเป็นแบบต่อเนื่อง อยู่ในช่วงของพันธุ์พ่อแม่ แต่ลูกผสมส่วนใหญ่จะมีค่าแอนโทไซยานินต่ำกระจายตัวไปในทิศทางของพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งแสดงถึงการเป็นลักษณะด้อยของปริมาณแอนโทไซยานิน โดยพบเพียง 4 families มีค่ามากกว่า 5 มก./100 ก. โดย 3 families มาจากลูกผสมชั่วที่ 2 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและมีสีม่วงทุกเมล็ดภายใน family ในลูกผสมชั่วที่ 3 และอีก 1 family จากสีน้ำตาลในลูกผสมชั่วที่ 2 และมีสีม่วงและขาวภายใน family ในลูกผสมชั่วที่ 3

การศึกษาระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล ศึกษาหาตำแหน่งยีนระหว่าง SSR markers กับลักษณะปริมาณแอนโทไซยานิน จำนวน 32 markers พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่ จำนวน 8 markers อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบด้วย bulk segregant analysis ในลูกผสมชั่วที่ 2 ปรากฏว่าไม่พบ marker ที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphism) สอดคล้องกับชนิดพ่อแม่

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าลักษณะการแสดงออกของยีนในลักษณะทางสัณฐานโดยเฉพาะการเกิดสีนั้นยีนมีการแสดงออกแบบข่มไม่สมบูรณ์ ไปจนถึงข่มสมบูรณ์ และข่มข้ามคู่ถูกควบคุมด้วยยีนจำนาน 2-3 คู่ ขณะที่การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของการสะสมปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดสูงนั้นถูกควบคุมด้วยยีนด้อย มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเชิงปริมาณด้วยยีนจำนวนมากคู่ จากความรู้นี้จะเป็นประโยชน์ในการวางแผนงานโครงการปรับปรุงพันธุ์ อีกทั้งช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวก่ำทั้งชนิดข้าวเจ้าและข้าวเหนียวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดสูง ไม่ไวต่อช่วงแสงและให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดเดิม โดยการเพิ่มจำนวนประชากรในการคัดเลือกให้มีขนาดใหญ่มากขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการพบต้นที่มีลักษณะที่ต้องการ

Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Genetic Control of Anthocyanin Contents in Purple Glutinous Rice
Author	Mr. Peeranan Mapan
Degree	Master of Science (Agriculture) Agronomy
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Sansanee Jumjod Advisor
	Lect. Dr. Chanakarn Thebault Prom-u-thai Co-advisor

ABSTRACT

Anthocyanin is known as one of the major an antioxidant compounds, which commonly observes in the local purple rice (black glutinous rice) that can be grown only once a year because they are photoperiod sensitivity varieties. To increase productivity, the purple rice varieties with high anthocyanin content and photoperiod insensitivity are required. Understanding in the inheritance of anthocyanin contents will help to facilitate breeding program. Therefore, the objective of this study was to identify in the inheritance of anthocyanin content in purple rice using F_1 to F_3 generations. The experiments were conducted at the Division of Agronomy, Department of Plant Science and Natural Resource, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University during June 2011 to June 2013.

In the first experiment, morphology characters (leaf blade color, leaf sheath color, auricle color, ligule color, node color, internode color, apiculus color, stigma color, tiller shape, hull color, awn and pericarp color), endosperm type and anthocyanin content in F_1 hybrids from Kum Doi Saket (KDK) and 4 white rice varieties and reciprocal crosses were compared with those of the parents. Dominant gene actions were found in the morphological characters with varied from

Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

partially dominance to complete dominance. No difference was found between reciprocal crosses in all trails. The anthocyanin content in all F_1 hybrids were to be very low and closed to the white rice parents.

In the second experiment, cross between KDK x PTT1 was selected. The F_2 plants were grown in dry season of 2012. There were two sets of this experiment. The first set, 300 F_2 plants were grown in the plastic pots, 1 plant per hill with 10 plants per pot. Morphological characters (leaf blade color, leaf sheath color, auricle color, ligule color, internode color, stigma color and awn) were recorded in this set. The second set, 600 plants were grown in the field experiment. Then 298 of 600 F_2 plants were selected as photoperiod insensitivity. Seeds of each plant were separated into two parts. In the first part, 10 seeds per plant were recorded for pericarp color and endosperm type by using iodine test. In the second part, 2.5 g of seeds were used for anthocyanin analysis. Morphological characters were controlled by 2-3 genes with complete dominant or epistasis gene actions. Leaf blade color, leaf sheath color, auricle color, ligule color, internode color, stigma color and awn were controlled by 2 genes and pericarp color was controlled by 3 genes. The distribution of anthocyanin content was skewed continuously toward that of the PTT1 parent, which anthocyanin content was expected to be a quantitative trait and controlled by many genes. High anthocyanin content was found in the purple pericarp more than half of the grain. However the highest level of purple pericarp intensity was found to have no anthocyanin to high anthocyanin. Endosperm type were found incomplete dominant gene action, which were segregated to non-glutinous, glutinous and both non-glutinous and glutinous within plant. Each endosperm type of the purple pericarp intensity was found to have high anthocyanin content. So, this can be utilized in the selection of the plants which are both non-glutinous or glutinous with high anthocyanin content.

In the third experiment, the F_2 plants with purple and brown pericarp were selected to grow for progeny test in F_3 generation. Altogether 137 families were grown. Gene action of Leaf blade color, leaf sheath color and pericarp color were confirmed as found in F_2 generation. Anthocyanin content of F_3s were similar with F_2s, which was skewed continuously toward that of the PTT1 parent. There were four families in F_3 that had anthocyanin content higher than 5 mg / 100 g. The three families were from the purple pericarp intensity in F_2 and all of purple pericarp

within family. One family was from brown pericarp in F_2 and segregated to be purple and white pericarp within family.

For DNA analysis, 32 SSR markers were used to evaluate the association between SSR markers and the anthocyanin trait. There were eight SSR markers that showed polymorphic between parent. However, they did not show polymorphic in bulk segregant analysis in F_2 populations.

This study illustrated that dominant and epistasis gene action control in morphological characters were dominant gene, varied from partially dominance to complete dominance and controlled by 2-3 genes while anthocyanin content was controlled by recessive genes and quantitatively inherited. These findings will be useful in breeding and selection both non-glutinous and glutinous endosperm types with high anthocyanin content and photoperiod insensitivity traits. Increasing the population size will provide more opportunity to find plants with desirable traits.

CHIANG MAI UNIVERSITY 1964
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved