บทที่ 4
ผลการทดลอง และวิจารณ์

การศึกษานี้ทำการทดลองทั้งหมด 6 การทดลอง คือ

1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ (donor parent) ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก เพื่อใช้สร้างกลุ่มประชากรตัวอย่างสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรตัวอย่างที่สร้างขึ้น

2. การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

3. การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง และคัดเลือกเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 และชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้พันธุ์แปดริ้ว และเมืองไทร

4. สร้างประชากรตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ได้แก่ ประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว ประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร

5. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์แปดริ้ว

6. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์เมืองไทร

ผลการทดลองที่ 1 การคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ (donor parent) ที่มีลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก เพื่อใช้สร้างกลุ่มประชากรตัวอย่างสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรตัวอย่างที่สร้างขึ้น

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในกลุ่มประชากรตัวอย่าง เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีเมล็ดต่อรวงมาก โดยทำการศึกษาในประชากรตัวอย่างใช้ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 เป็นพันธุ์รับ แล้วทำการคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ (donor parent) จากรายงานพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก (วราภรณ์, 2551) ซึ่งได้รวบรวม และศึกษาข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก และข้าวพันธุ์ต่างๆ ทั้งหมด 43 พันธุ์ โดยทำการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุดประกอบกับลักษณะความสูง และอายุวันออกดอก ซึ่งข้าวแต่ละพันธุ์มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อรวงเรียงลำดับจากมากที่สุดไปหาน้อยที่สุดดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ข้อมูลลักษณะความสูง อายุออกดอก และจำนวนเมล็ดทั้งหมดของข้าวพันธุ์พื้นเมืองและข้าวไทยที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ พันธุ์ต่างๆ ทั้งหมด 43 พันธุ์

ลำดับ	พันธุ์	ความสูง (เซนติเมตร)	อายุออกดอก (วัน)	จำนวนเมล็ดทั้งหมด (เมล็ด)
1	เมืองไทร	166	145	338
2	แปดริ้ว	212	128	266
3	เม็ดมะเขือ	181	138	264
4	ข้าวแก้วดอ	210	107	262
5	ช่อลุง	222	147	261
6	เหลืองหอม	214	147	261
7	นางพญา 132	203	147	256
8	หวัน 2	198	115	255
9	หวัน 1	185	117	253
10	งวงช้าง	203	147	249

ตาราง 1 (ต่อ)

ลำดับ	พันธุ์	ความสูง (เซนติเมตร)	อายุออกดอก (วัน)	จำนวนเมล็ดทั้งหมด (เมล็ด)
11	กข 13	201	147	249
12	ข้าวเหนียวแดง	208	119	247
13	เข็มทอง	200	147	245
14	ข้าวแม่ผึ้ง	205	120	230
15	กันตัง	205	147	226
16	ข้าวชาบีต้า	204	107	224
17	ข้าวทองมะโร	209	110	224
18	ข้าวเล้าแตก	186	117	224
19	ข้าวกรุง	226	119	220
20	ข้าวหล่ม	204	110	219
21	ข้าวหมากแขก	192	107	214
22	ข้าวอิฐขาว	209	119	212
23	ข้าวก่ำ	188	119	212
24	ข้าวพ่อมุข	202	107	210
25	ข้าวเหลืองพันธุ์งาม	204	107	207
26	กข 6	195	113	207
27	ทรายทอง	205	147	206
28	แบ้ร์เด้อ	146	84	204
29	ข้าวนางหก	197	107	204
30	ข้าวเหนียว	205	115	196
31	ข้าวแตงอ่อน	219	119	195
32	ข้าวดวงจันทร์	206	111	195
33	นาแต้	160	87	188
34	กข 10	126	107	181
35	ดอกพะยอม	151	97	179
36	จาแอ๊	169	84	165

ตาราง 1 (ต่อ)

ลำดับ	พันธุ์	ความสูง (เซนติเมตร)	อายุออกดอก (วัน)	จำนวนเมล็ดทั้งหมด (เมล็ด)
37	บือโพปริ	113	86	165
38	สันป่าตอง 1	133	100	164
39	ข้าวเหลือง (ด้ะ)	125	83	131
40	จานอสี	117	84	120
41	บือกะ	140	84	118
42	Taichung 65	113	88	116
43	จากอลอย จาเฟ้ย	124	84	107

ที่มา: วราภรณ์ (2551)

จากข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวทั้ง 43 พันธุ์ พบว่าพันธุ์ข้าวที่สามารถใช้เป็นพันธุ์ให้ได้ ได้แก่ พันธุ์เมืองไทร พันธุ์แปดริ้ว และพันธุ์เม็ดมะเขือ เนื่องจากมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ยสูงถึง 338 266 และ 264 เมล็ด ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบข้อมูลลักษณะของข้าวพันธุ์รับ กข 6 และชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้ทั้งสามพันธุ์ คือ เมืองไทร แปดริ้ว และเม็ดมะเขือ ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ตารางแสดงลักษณะของข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ที่ใช้ในการวิจัย

พันธุ์ข้าว	ลักษณะของข้าว			
	ความสูง (เซนติเมตร)	อายุออกดอก (วัน)	จำนวนเมล็ดทั้งหมด (เมล็ด)	ความไวต่อช่วงแสง
กข 6	195	113	207	ไวต่อช่วงแสง
ชัยนาท 1	113	110	133	ไม่ไวต่อช่วงแสง
เมืองไทร	166	145	338	ไวต่อช่วงแสง
แปดริ้ว	212	128	266	ไวต่อช่วงแสง
เม็ดมะเขือ	181	138	264	ไวต่อช่วงแสง

จากข้อมูลพบว่าข้าวพันธุ์แปดริ้วมีอายุวันออกดอก 128 วัน ใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ กข 6 ที่มีอายุออกดอกเท่ากับ 113 วัน ในขณะที่ข้าวพันธุ์เม็ดมะเขือ กับข้าวพันธุ์เมืองไทรมีอายุออกดอก 138 และ 145 วัน ซึ่งห่างจากอายุออกดอกของข้าวพันธุ์ กข 6 ถึง 25 และ 32 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความสูง พบว่าข้าวพันธุ์แปดริ้ว เม็ดมะเขือ และข้าวพันธุ์ กข 6 มีความสูงใกล้เคียงกัน คือ 212 181 และ 195 เซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่ข้าวพันธุ์เมืองไทรมีความสูงเฉลี่ย 166 เซนติเมตร ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการกระจายตัวของลักษณะอายุออกดอก และความสูงในประชากร F_2 จึงคัดเลือกข้าวพันธุ์แปดริ้วซึ่งมีลักษณะอายุออกดอก และความสูงใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ กข 6 และมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่าพันธุ์เม็ดมะเขือ เป็นพันธุ์ให้ในการสร้างประชากรเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งการสร้างประชากรเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ต้องมีความแตกต่างกันของลักษณะที่ต้องการปรับปรุงมากแต่ไม่มีความแตกต่างกันหรือมีความแตกต่างกันน้อยในลักษณะอื่น ๆ (ดำเนิน, 2545)

ในขณะที่ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 มีความสูง 113 เซนติเมตร มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ย 133 เมล็ด (กรมวิชาการเกษตร, 2543) ได้คัดเลือกข้าวพันธุ์ให้โดยพิจารณาลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงเพียงลักษณะเดียว ได้ข้าวพันธุ์เมืองไทรเนื่องจากมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่าข้าวพันธุ์เม็ดมะเขือ ซึ่งข้าวพันธุ์ให้เมืองไทรมีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อรวงมากกว่าข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 สูงถึง 205 เมล็ด

ผลการทดลองที่ 2 การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

จากการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูลพันธุกรรมข้าวในเว็บไซต์ Gramene (http://www.gramene.org/markers/microsat/) ซึ่งได้รวบรวมเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ตำแหน่งต่างๆ บนโครโมโซมของข้าวในตาราง supplementary table 18 แล้วทำการคัดเลือกเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้ง 4 ยีน ได้แก่ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*

จากการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* บนโครโมโซมที่ 1 ตำแหน่งเบสที่ 5,269,103-5,274,678 จากตาราง supplementary table 18 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM3530 ถึง RM10327 ซึ่งอยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 5,150,000-5,442,090 บนโครโมโซมที่ 1 สอดคล้องกับรายงานของ Ashikari และคณะ (2005) ซึ่งได้รายงานตำแหน่งของยีน OsCKX2 หรือ ยีน *Gn1a* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง บนโครโมโซมที่ 1 มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP คือ R3192 และ C12072S อยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 5,109,961-5,513,259 เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Liu และคณะ (2009) ที่พบว่ายีน *Gn1a* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR คือ RM3604 และ RM1195 อยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 5,139,287-6,153,141 เบส จากการคัดเลือกได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง ได้แก่ RM10306, RM10310, RM10311, RM10312, RM10313, RM10314, RM10315, RM10316, RM10318, RM10319, RM10326 และ RM10327 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละตำแหน่งมีระยะจากยีน *Gn1a* และลำดับเบสของไพรเมอร์ดังแสดงในตาราง 3

2.2 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1*

จากการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* บนโครโมโซมที่ 1 ตำแหน่งเบสที่ 6,623,963-6,629,463 จากตาราง supplementary table 18 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM10390 ถึง RM10402 ซึ่งอยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 6,580,847-6,692,330 บนโครโมโซมที่ 1 สอดคล้องกับรายงานของ Zhang และคณะ (2009) ที่ศึกษา QTL ที่ควบคุมลักษณะจำนวนดอกต่อรวง ได้รายงานว่า *qSPP1* อยู่ตำแหน่งระหว่างเครื่องหมาย MRG2746 และ RM490 ซึ่งอยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 6,154,997-6,676,632 และตรงกับรายงานการศึกษาของ Liu และคณะ (2009) ซึ่งได้ศึกษาจนสามารถเข้าใกล้ตำแหน่งของ *SPP1* พบว่าอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM8111 และ RM490 ซึ่งอยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 6,153,045-6,676,632 จากการคัดเลือกได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง ได้แก่ RM10390, RM10393, RM10394, RM10395, RM10396, RM10397, RM10398, RM10400, RM10401 และ RM10402 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละตำแหน่งมีระยะจากยีน *SPP1* และลำดับเบสของไพรเมอร์ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 3 เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 12 เครื่องหมาย ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Gn1a* ที่คัดเลือกได้จากตาราง supplementary table 18

Order	RM Locus ID	Chr.	SSR Start (base)	SSR End (base)	Distance (base)	Forward primer Sequences 5----->3	Reverse primer Sequences 5----->3
1	RM3530	1	5,150,000	5,150,077	119,026	GGAGATTCCCTTCCATGTATGC	ACGAGCTCAGTGTCACCATCG
2	RM10310	1	5,200,997	5,201,016	68,087	TGCAGTAATATGCTGTGCTGATCG	AAGCTAGCTCGATTGGTCGAACG
3	RM10311	1	5,215,576	5,215,596	53,507	TGGCGTAGTTCATGGCGTAGTGG	ACCATCTCCCATGTCGAAGTACGG
4	RM10312	1	5,232,170	5,232,189	36,914	TGGCATACGCGTGGTAGTCC	CAGAGGTGGAGGTGTCAGTCG
5	RM10313	1	5,236,487	5,236,516	32,587	ACTTACACAAGGCCGGGAAAGG	TGGTAGTGGTAACTCTACTCCGATGG
6	RM10314	1	5,241,778	5,241,797	27,306	CATGCATACTTTGTGCCTTGTCC	GCACGTGCTCCTACATTGATGC
7	RM10315	1	5,243,215	5,243,274	25,829	CAAGTTGCACACACCAAGATGC	CCCTCCTGATCATATCCCTTGC
	Gn1a		5,269,103	5,274,678			
8	RM10316	1	5,286,497	5,286,516	11,819	AAGATCGCTGGGAGATCTGTAGG	GCATGCTAATTAGTCAGCCTTGG
9	RM10318	1	5,359,033	5,359,052	84,355	TGTCTCACACATTGCACACTTACC	GGCCTAACCCAACACATGTCC
10	RM10319	1	5,363,131	5,363,152	88,453	TCTAACACAGAACTCCCGAAGATCC	CGATCAGGAGCGTTACATATTTGG
11	RM10326	1	5,368,282	5,368,307	93,604	AGCCGGGCATACAGTCTTTCTCC	TCATGGCGTGTTGGCACTAGC
12	RM10327	1	5,442,070	5,442,090	167,392	ACTTCTGTTGTCCCACTGACAGG	GAGAGGTCGTCGAGGAACAGC

ที่มา: http://www.gramene.org/markers/microsat

ตาราง 4 เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 10 เครื่องหมาย ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *SPP1* ที่คัดเลือกได้จากตาราง supplementary table 18

Order	RM Locus ID	Chr.	SSR Start (base)	SSR End (base)	Distance (base)	Forward primer Sequences 5----->3	Reverse primer Sequences 5----->3
1	RM10390	1	6,580,847	6,580,868	43,095	GCAACGTTACGTCTTGGCATGG	CCTCTCGCGTCTCTCTCAACG
2	RM10393	1	6,600,019	6,600,054	23,909	GGCAGAGAAGATCGAATATGATGG	TAGCTACGCGCGTTCTTCATAGC
	SPP1		6,623,963	6,629,463			
3	RM10394	1	6,629,276	6,629,295	- 187	CAGCAGCAGCGAGATTAACAGC	GTCGTCTCTTGCTCTGTTCTTGG
4	RM10395	1	6,639,665	6,639,712	10,202	GCAAGATTCAGTTCAGGTTTGC	ATGTGCCCTTTCGTTGTACTCC
5	RM10396	1	6,639,789	6,639,840	10,326	TTTGCAGGTGGACAGGAAATGG	AATAGCAGCTTGCTTGGATGTGC
6	RM10397	1	6,646,567	6,646,604	17,104	ATGTCGAGCGGTGGTTGTATAGTTCG	ACCGTGATTTGGTTGTGTTTCAGC
7	RM10398	1	6,672,572	6,672,613	43,109	TCTCCTTGCTCTACTGCCTTTGG	TTCTGCAACTTGCCAAGAAGACC
8	RM10400	1	6,673,948	6,673,997	44,485	CTCTCTCCTGATGGTAAACTCTCC	ATATAGAGGTGCCTTGTGTGAAGG
9	RM10401	1	6,676,165	6,676,190	46,702	ACACACTCACACCCATCCATCC	TGATCTGCACACTGCAAACACC
10	RM10402	1	6,692,293	6,692,330	62,830	TGGATTGAAGGGAGCTCTACACC	TTGCTCCACACGATCTACACAGC

ที่มา: http://www.gramene.org/markers/microsat

2.3 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7*

จากการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* บนโครโมโซมที่ 7 ตำแหน่งเบสที่ 9,151,408-9,175,046 จากตาราง supplementary table 18 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM21330 ถึง RM21342 ซึ่งอยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 8,910,448-9,427,786 บนโครโมโซมที่ 7 สอดคล้องกับรายงานการโคลนยีนของ Xue และคณะ (2008) ที่ศึกษายีน *Ghd7* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมลักษณะปริมาณผลผลิต และในรายงานได้กล่าวว่ายีน *Ghd7* อยู่ระหว่างเครื่องหมายชนิด SSR marker RM3859 ถึงเครื่องหมายชนิด RFLP คือ C39 ซึ่งอยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 8,910,448-11,361,086 นอกจากนี้ในรายงานการศึกษาของ Zhang และคณะ (2009) ได้ผลสรุปว่า *qSPP7* ซึ่งมีตำแหน่งระหว่างเครื่องหมาย MRG4436 และ RM2 เป็นบริเวณเดียวกับลักษณะจำนวนดอกข้าวต่อรวง และจำนวนเมล็ดต่อรวง (*sp7* และ *gn7*) มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย MRG4436 หรือ RM5436 ที่ตำแหน่งเบส 9,074,712 คือ ยีน *Ghd7* จากการคัดเลือกได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง ได้แก่ RM21330, RM21332, RM21333, RM21334, RM5436, RM21335, RM21336, RM21339, RM21340 และ RM21342 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละตำแหน่งมีระยะจากยีน *Ghd7* และลำดับเบสของไพรเมอร์ดังแสดงในตาราง 5

2.4 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP*

จากการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* บนโครโมโซมที่ 8 ตำแหน่งเบสที่ 25,271,735-25,275,982 จากตาราง supplementary table 18 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM23408 ถึง RM23436 ซึ่งอยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 25,075,193-25,474,467 บนโครโมโซมที่ 8 สอดคล้องกับรายงานของ Miura และคณะ (2010) ซึ่งรายงานการศึกษายีน *WFP* ที่ควบคุมลักษณะการแตกแขนงของรวงข้าวว่าอยู่บนโครโมโซมที่ 8 ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR คือ RM531 และ RM264 ซึ่งอยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 22,469,338-29,855,660 เช่นเดียวกับรายงานผลการศึกษาของ Jiao และคณะ (2010) ที่ได้ศึกษาการควบคุมการทำงานของยีนดังกล่าว พบว่าอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM149 และ RM1345 ซึ่งอยู่ในช่วงของตำแหน่งเบสที่ 24,721,368-26,145,039 จากการคัดเลือกได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 15 ตำแหน่ง ได้แก่ RM23408, RM23409, RM23419, RM23421, RM23422, RM23423, RM23425, RM23426, RM23427, RM23428, RM23429, RM23430, RM23433, RM23434 และ RM23436 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละตำแหน่งมีระยะจากยีน *WFP* และลำดับเบสของไพรเมอร์ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 5 เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 10 เครื่องหมาย ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Ghd7* ที่คัดเลือกได้จากตาราง supplementary table 18

Order	RM Locus ID	Chr.	SSR Start (base)	SSR End (base)	Distance (base)	Forward primer Sequences 5----->3	Reverse primer Sequences 5----->3
1	RM21330	7	8,910,448	8,910,503	240,905	CTCATGCTTTCAGTCATTCAGTGC	TCCTGGATTCATGGTGTCTTTAGC
2	RM21332	7	9,036,131	9,036,150	115,258	CAAGAACACGCTGACACCATAAGC	GGCTACCTCGACTACGGCAACC
3	RM21333	7	9,043,958	9,044,009	107,399	ATTCCAACGGTCCAGTTCAGAGG	CACGCAGTGTGGTGTGGTAAGC
4	RM21334	7	9,071,275	9,071,310	80,098	GACTTGGGCGGCAGCTTATTCC	TGTTGTTCCACTCATCACACCTCTCC
5	RM5436	7	9,074,712	9,074,872	76,536	CAAAGGGGGTGTCCTCTATG	GTTGCTCGTCCTACATGTGC
6	RM21335	7	9,107,916	9,107,949	43,459	TGAGCTGCACAAGACAGACAAGC	ACCATTTGAACAGGATGGACTGG
7	RM21336	7	9,151,105	9,151,271	137	GTGCTTGCATATAACCTATA	AGATCAACCTTCTTATTCAG
	Ghd7		9,151,408	9,175,046			
8	RM21339	7	9,187,154	9,187,174	12,108	CAGCTAGCTAGGGTTGTGAAATGC	GACCAAATCCATCCACAGATCG
9	RM21340	7	9,275,340	9,275,359	100,294	GGGAGAGCGAGAGCAAGAGAACG	TTGTTGTCAGTCTCCATGCCAATCC
10	RM21342	7	9,427,766	9,427,786	252,720	CTCCTGGTCGCAAGAAGAAGG	CAAACAACAGCATCAGCATCACC

ที่มา: http://www.gramene.org/markers/microsat

ตาราง 6 เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 15 เครื่องหมาย ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *WFP* ที่คัดเลือกได้จากตาราง supplementary table 18

Order	RM Locus ID	Chr.	SSR Start (base)	SSR End (base)	Distance (base)	Forward primer Sequences 5----->3	Reverse primer Sequences 5----->3
1	RM23408	8	25,075,193	25,075,286	196,449	CCATCTCAACTCCTTCGTTTACTGC	TCGACTGTTTGCTTGGAATAGGC
2	RM23409	8	25,084,225	25,084,254	187,481	ATCAGGAAGCTGCAAGAACTCG	TTTGGAGTGGTCCTTGTACTGC
3	RM23419	8	25,222,439	25,222,522	49,213	ACCTGAGCTCGATGGTTCTTTCC	GCTCCCACCAAGTATTCCTATCG
4	RM23421	8	25,246,335	25,246,372	25,363	ATGGACATGTGGTTAAGCATCG	TGCCAAGTAAGGACATACTCTACTCC
5	RM23422	8	25,246,687	25,246,706	25,029	GTCGGTCACGAAGTTCAGATCC	TCAGGCAAAGTTGAAGATGGTAGC
6	RM23423	8	25,256,213	25,256,232	15,503	CGGCGGATAGTTAAAGAAGATCG	GCAGGTTACCGCAATAGCATCC
7	RM23425	8	25,271,025	25,271,045	690	TGGCGGCAGTAGTAGTTCTTGATCC	GCCGTCCTCGTCTTCCAAGG
	WFP		25,271,735	25,275,982			
8	RM23426	8	25,320,052	25,320,072	44,070	CATCATGTCGCGGTAGAACTCG	AGAGGTACAGTGGCACGATCAGG
9	RM23427	8	25,333,966	25,333,986	57,984	AGGGAGTCGGAGACCATGACG	TACCGCGTATCATGTCCTTGACG
10	RM23428	8	25,344,812	25,344,832	68,830	ACAGTACTAGCACAGCTGAAGGAAGG	GCAGCGATAACCACATTTCTTGC
11	RM23429	8	25,346,453	25,346,473	70,471	CGGCGAGGTAGAAGGTGACG	CAGTGATTGTGTGACAGTGTGAGAGG
12	RM23430	8	25,351,278	25,351,305	75,296	AAAGCTAGCCCAGGGTGAAGC	GAAATGGACAGAGGTATGGTACGC
13	RM23433	8	25,373,795	25,373,838	97,813	CTGCAACACCAGTAACTCTAGATCG	CCAAGAACAGCAAGAACAACC
14	RM23434	8	25,394,421	25,394,452	118,439	GGAATCCGGTACCACGAGAAGG	TCTCCTCTCAAGGATCCAAAGACC
15	RM23436	8	25,474,448	25,474,467	198,466	TGAGTCACCGTGCACCATCTCC	GTGGTGGTGCGAATCACTGTAGG

ที่มา: http://www.gramene.org/markers/microsat

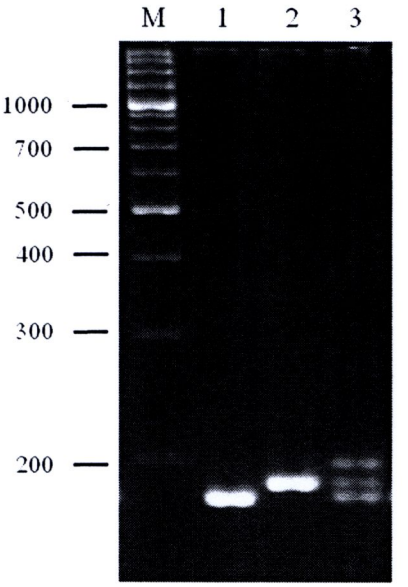
ผลการทดลองที่ 3 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง และคัดเลือกเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 และชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้พันธุ์แปดริ้ว และเมืองไทร

ทำการตรวจหาความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 และชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว และเมืองไทร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR marker ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 2 เป็นไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ได้ผลการทดลองดังนี้

3.1 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้กับข้าวพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้ คือ พันธุ์แปดริ้ว

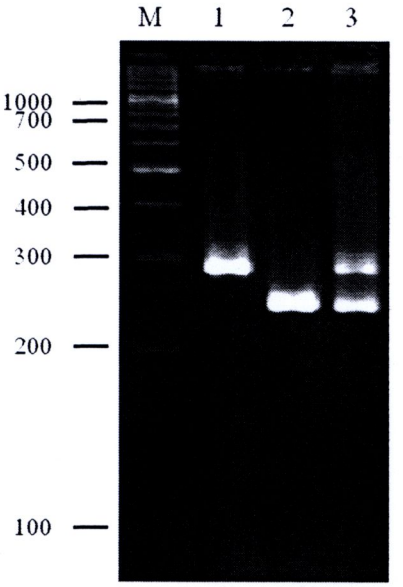
เมื่อนำเครื่องหมาย SSR ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Gn1a* มาใช้เป็นไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แปดริ้ว และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว เป็นแม่พิมพ์ เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายที่ให้ขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แตกต่างจากขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์แปดริ้ว พบว่าเมื่อใช้เครื่องหมาย RM10318, RM10319 และ RM10326 เป็นไพรเมอร์ มีความแตกต่างระหว่างขนาดแถบดีเอ็นเอของ กข 6 และแปดริ้ว โดยที่เครื่องหมาย RM10318 ซึ่งมีระยะใกล้กับยีน *Gn1a* มากที่สุดที่จำนวน 86,553 เบส จึงสามารถใช้เป็น target linked marker ได้ ดังแสดงในภาพ 14

จากการคัดเลือก SSR marker ที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *SPP1* ทั้งหมด จำนวน 10 ตำแหน่ง เมื่อนำมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างขนาดแถบดีเอ็นเอของ กข 6 และแปดริ้ว พบว่าเมื่อใช้เครื่องหมาย RM10390, RM10395, RM10396 และ RM10397 เป็นไพรเมอร์แล้วให้ขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน ซึ่ง RM10395 มีระยะใกล้กับยีน *SPP1* มากที่สุดที่จำนวน 10,202 เบส จึงสามารถใช้เป็น target linked marker ได้ ดังแสดงในภาพ 15



ภาพ 14 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย RM10318 ที่อยู่ใกล้กับยีน *Gn1a* เป็นไพรเมอร์

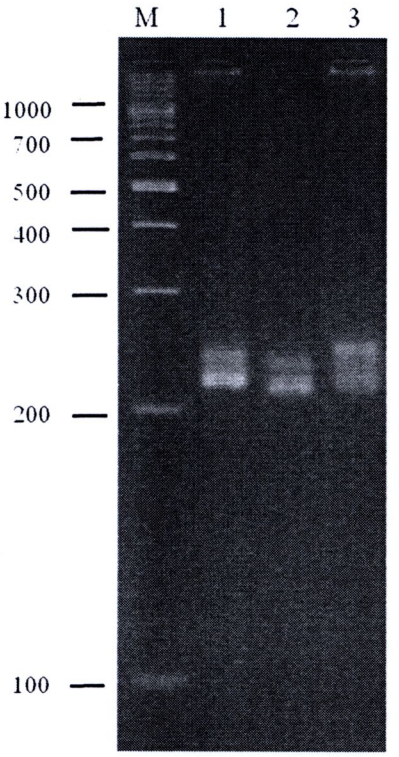
หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แปดริ้ว และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์รับ กข 6 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว และเลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ตามลำดับ



ภาพ 15 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้กับยีน *SPP1* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แปดริ้ว และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์รับ กข 6 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว และเลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ตามลำดับ

สำหรับเครื่องหมาย SSR ที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Ghd7* จำนวน 10 ตำแหน่ง เมื่อนำมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างขนาดแถบดีเอ็นเอของ กข 6 และแปดริ้ว พบว่าเมื่อใช้เครื่องหมาย RM5436 และ RM21335 เป็นไพรเมอร์แล้วให้ขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยที่ RM21335 มีระยะใกล้กับยีน *Ghd7* มากที่สุด คือ 76,610 เบส จึงใช้เป็น target linked marker ได้ ดังแสดงในภาพ 16

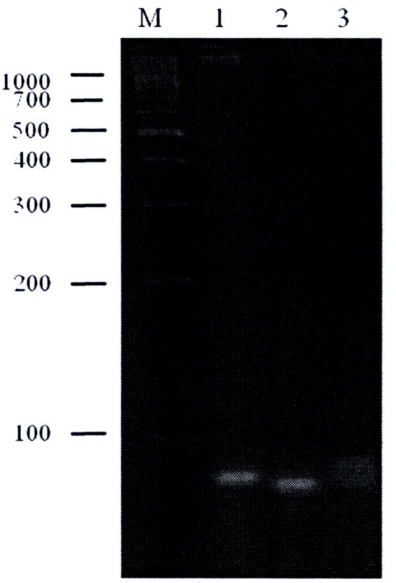


ภาพ 16 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย RM21335 ที่อยู่ใกล้กับยีน *Ghd7* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แปดริ้ว และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์รับ กข 6 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว และเลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ตามลำดับ

เมื่อนำเครื่องหมาย SSR ทั้งหมด 15 ตำแหน่ง ที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *WFP* มาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างขนาดแถบดีเอ็นเอของ กข 6 และแปดริ้ว พบว่ามีเพียงเครื่องหมาย RM23428 ที่แสดงความแตกต่างของขนาดแถบดีเอ็นเอ และมีระยะใกล้กับยีน *WFP* ที่ 68,830 เบส จึงใช้เป็น target linked marker ได้ ดังแสดงในภาพ 17 ซึ่งจากการคัดเลือกได้เครื่องหมาย SSR ดังสรุปในตาราง 7 จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมา

ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่าง และอยู่ในบริเวณที่ได้มีการรายงานว่าเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณผลผลิตข้าวดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น



ภาพ 17 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย RM23428 ที่อยู่ใกล้กับยีน *WFP* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แปดริ้ว และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์รับ กข 6 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว และเลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ตามลำดับ

ดังนั้นเครื่องหมายดังกล่าวสามารถใช้คัดเลือกต้นข้าวที่มียีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ในการสร้างประชากรของลูกผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

ตาราง 7 ตารางสรุปผลการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว

Order	RM Locus ID	Gene	Chr.	SSR Start (base)	SSR End (base)	Distance (base)	Forward Primer Sequences sequence 5--->3	Reverse Primer Sequences sequence 5--->3
1		*Gn1a*	1	5,269,103	5,274,678			
	RM10318	*Gn1a*	1	5,359,033	5,359,052	84,355	TGTCTCACACATTGCACACTTACC	GGCCTAACCCAACACATGTCC
2		*SPP1*	1	6,623,963	6,629,463			
	RM10395	*SPP1*	1	6,639,665	6,639,712	10,202	GCAAGATTCAGTTCAGGTTTGC	ATGTGCCCTTTCGTTGTACTCC
3		*Ghd7*	7	9,151,408	9,175,046			
	RM21335	*Ghd7*	7	9,107,916	9,107,949	76,610	TGAGCTGCACAAGACAGACAAGC	ACCATTTGAACAGGATGGACTGG
4		*WFP*	8	25,271,735	25,275,982			
	RM23428	*WFP*	8	25,344,812	25,344,832	68,830	ACAGTACTAGCACAGCTGAAGGAAGG	GCAGCGATAACCACATTTCTTGC

3.2 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้กับข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 และพันธุ์ให้ คือ พันธุ์เมืองไทร

เมื่อนำเครื่องหมาย SSR ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง ที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Gn1a* มาใช้เป็นไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เมืองไทร และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทรเป็นแม่พิมพ์ เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายที่ให้ขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แตกต่างจากขนาดแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์เมืองไทร พบว่าเมื่อใช้เครื่องหมาย RM10316 และ RM10326 เป็นไพรเมอร์แล้วมีความแตกต่างระหว่างขนาดแถบดีเอ็นเอของชัยนาท 1 และเมืองไทร โดยที่เครื่องหมาย RM10316 ซึ่งมีระยะใกล้กับยีน *Gn1a* มากที่สุด คือ 14,017 เบส สามารถใช้เป็น target linked marker ได้ ดังแสดงในภาพ 18

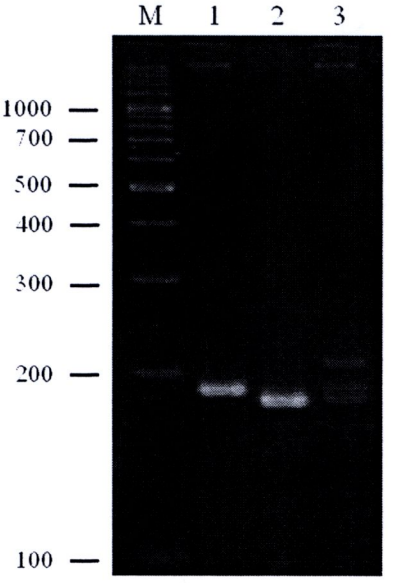
จากการคัดเลือก SSR marker ที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *SPP1* ทั้งหมด จำนวน 10 ตำแหน่ง เมื่อนำมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างขนาดแถบดีเอ็นเอของชัยนาท 1 และเมืองไทร พบว่ามีเพียงเครื่องหมาย RM10402 เท่านั้นที่ให้ขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยมีระยะใกล้กับยีน *SPP1* เท่ากับ 62,830 เบส สามารถใช้เป็น target linked marker ได้ ดังภาพ 19

สำหรับเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Ghd7* จำนวน 10 ตำแหน่ง เมื่อนำมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างขนาดแถบดีเอ็นเอของชัยนาท 1 และเมืองไทร พบว่ามีเพียงเครื่องหมาย RM21330 เท่านั้นที่ให้ขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะมีระยะจากยีน *Ghd7* ถึง 294,497 เบส และไม่พบว่ามีเครื่องหมายใดที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Ghd7* ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างชัยนาท 1 กับเมืองไทร จึงคัดเลือกเพื่อใช้เป็น target linked marker ดังแสดงในภาพ 20

เมื่อนำเครื่องหมาย SSR marker ทั้งหมด จำนวน 15 ตำแหน่ง ที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *WFP* มาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างขนาดแถบดีเอ็นเอของชัยนาท 1 และเมืองไทร พบว่าเมื่อใช้เครื่องหมาย RM23433 และ RM23434 เป็นไพรเมอร์แล้วให้ขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยที่ RM23433 มีระยะใกล้กับยีน *WFP* มากที่สุด คือ 97,813 เบส จึงใช้เป็น target linked marker ได้ ดังแสดงในภาพ 21 ซึ่งจากการคัดเลือกได้เครื่องหมาย SSR ดังสรุปในตาราง 8

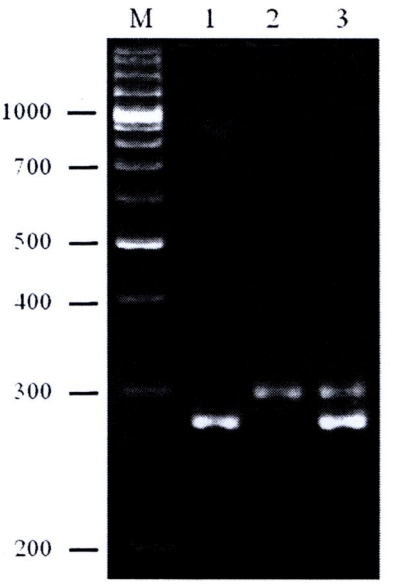
จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับชัยนาท 1 และพันธุ์ให้เมืองไทร พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างและอยู่ในบริเวณที่ได้มีการรายงานว่าเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณผลผลิตข้าวดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

ดังนั้นเครื่องหมายดังกล่าวสามารถใช้คัดเลือกต้นข้าวที่มียีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ในการสร้างประชากรของลูกผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทรเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง



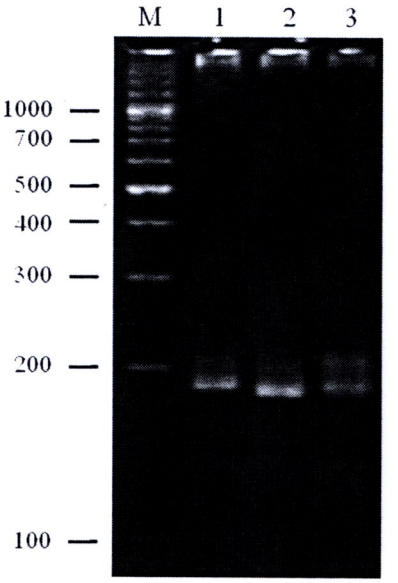
ภาพ 18 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้กับยีน *Gn1a* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เมืองไทร และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร และเลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ตามลำดับ



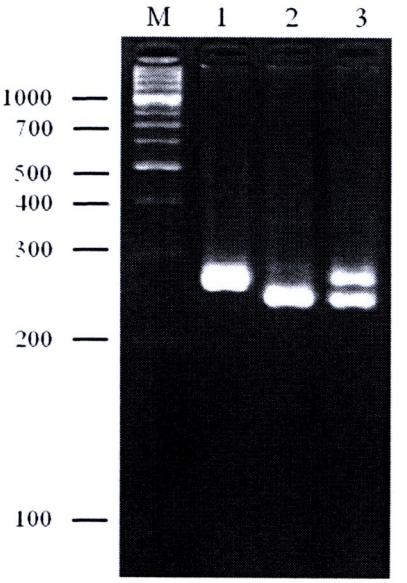
ภาพ 19 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย RM10402 ซึ่งอยู่ใกล้กับยีน *SPP1* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เมืองไทร และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร และเลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ตามลำดับ



ภาพ 20 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย RM21330 ซึ่งอยู่ใกล้กับยีน *Ghd7* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เมืองไทร และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร และเลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ตามลำดับ



ภาพ 21 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย RM23433 ที่อยู่ใกล้กับยีน *WFP* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เมืองไทร และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร และเลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ตามลำดับ

ตาราง 8 ตารางสรุปผลการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร

Order	RM Locus ID	Gene	Chr.	SSR Start (base)	SSR End (base)	Distance (base)	Forward Primer Sequences sequence 5--->3	Reverse Primer Sequences sequence 5--->3
1		*Gn1a*	1	5,269,103	5,274,678			
	RM10316	*Gn1a*	1	5,286,497	5,286,516	11,819	AAGATCGCTGGGAGATCTGTAGG	GCATGCTAATTAGTCAGCCTTGG
2		*SPP1*	1	6,623,963	6,629,463			
	RM10402	*SPP1*	1	6,692,293	6,692,330	62,830	TGGATTGAAGGGAGCTCTACACC	TTGCTCCACACGATCTACACAGC
3		*Ghd7*	7	9,151,408	9,175,046			
	RM21330	*Ghd7*	7	8,910,448	8,910,503	294,497	CTCATGCTTTCAGTCATTCAGTGC	TCCTGGATTCATGGTGTCTTTAGC
4		*WFP*	8	25,271,735	25,275,982			
	RM23433	*WFP*	8	25,373,795	25,373,838	97,813	CTGCAACACCAGTAACTCTAGATCG	CCAAGAACAGCAAGAACAACC

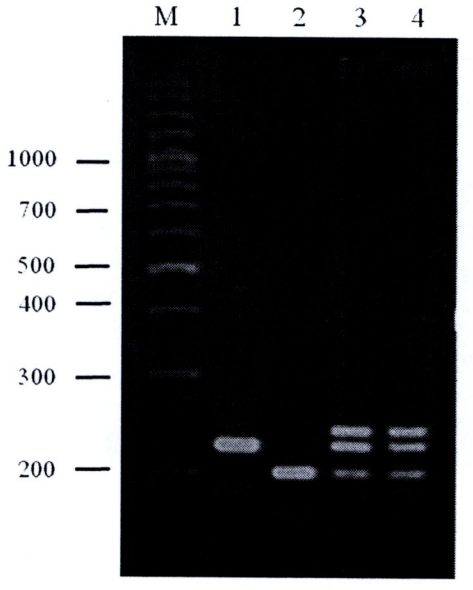
ผลการทดลองที่ 4 สร้างประชากรตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ได้แก่ ประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว ประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในกลุ่มประชากรตัวอย่าง เพื่อการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงให้ข้าวมีเมล็ดต่อรวงมาก ได้สร้างประชากรตัวอย่างในการศึกษา ได้แก่ ประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 คือ แปดริ้ว ประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 คือ เมืองไทร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก ตามแผนการผสมพันธุ์ข้าว ดังภาพ 9 และ 11 ได้ผลดังนี้

4.1 คู่ผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับพันธุ์แปดริ้ว

4.1.1 การคัดเลือกต้น F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ทำการผสมพันธุ์ข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว ผลิตเมล็ด F_1 ของ กข 6 และแปดริ้ว ในฤดูนาปี พ.ศ. 2551 ได้จำนวน 53 เมล็ด ต่อมาในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2552 ทำการเพาะเมล็ดแล้วคัดเลือกต้น F_1 ด้วยเครื่องหมาย Glu23 เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 ซึ่งเป็นข้าวเหนียวกับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้วที่เป็นข้าวเจ้าชัดเจนดังภาพ 22 ประกอบกับยังไม่พบเครื่องหมายที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้วได้ ซึ่งจากผลการคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย Glu23 ได้ต้น F_1 ที่มีแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัส (Wxwx) จำนวน 2 ต้น จากนั้นนำต้น F_1 ที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหา กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1 ได้จำนวน 9 เมล็ด ขณะเดียวกัน ต้น F_1 ที่ผสมตัวเองได้เมล็ด F_2 จำนวน 73.44 กรัม เพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ในฤดูที่ 3 นาปี พ.ศ. 2552

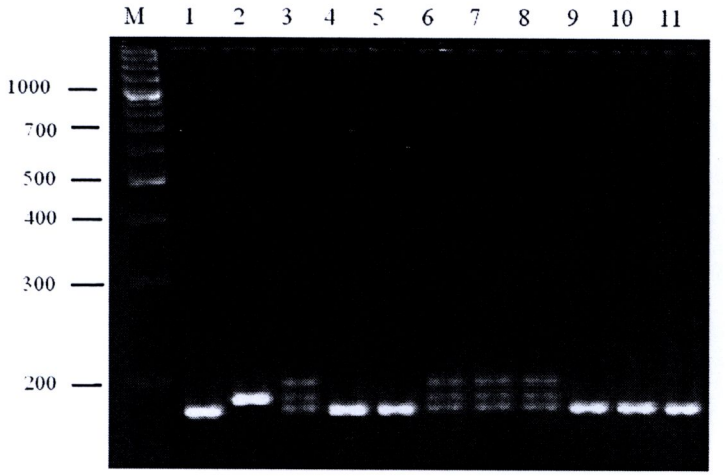


ภาพ 22 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย Glu23 เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ข้าวเจ้าพันธุ์แปดริ้ว และ F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์รับ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (wxwx) เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ให้ ข้าวเจ้าพันธุ์แปดริ้ว (WxWx) เลนที่ 3 และ 4 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของลูกผสม F_1 ระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว (Wxwx) ต้นที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

4.1.2 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ทำการเพาะเมล็ด BC_1F_1 ของ กข 6 และแปดริ้ว ในฤดูนาปี พ.ศ. 2552 แล้วคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10318 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Gn1a* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากทั้งหมด 9 ต้น คัดเลือกได้ 4 ต้น ได้แก่ BC_1F_1-1988 BC_1F_1-1987 BC_1F_1-1988 และ BC_1F_1-1989 ดังภาพ 23 แล้วทำการผสมกลับไปหาพันธุ์ กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1 ได้เมล็ด BC_2F_1 รวมทั้งหมดจำนวน 147 เมล็ด

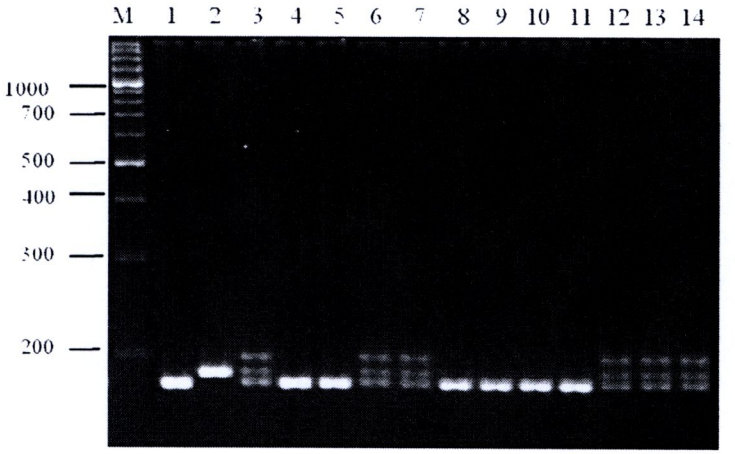


ภาพ 23 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในการคัดเลือกต้น BC_1F_1 เมื่อใช้เครื่องหมาย RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แปดริ้ว และต้น BC_1F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ทั้งหมด 9 ต้น โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ กข 6 เลนที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์แปดริ้ว เลนที่ 3-11 คือต้น BC_1F_1-1982 BC_1F_1-1983 BC_1F_1-1985 BC_1F_1-1987 BC_1F_1-1988 BC_1F_1-1989 BC_1F_1-1990 BC_1F_1-1991 และ BC_1F_1-1992 คัดเลือกได้ต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือ ต้น BC_1F_1-1982 BC_1F_1-1987 BC_1F_1-1988 และ BC_1F_1-1989 (เลนที่ 3 6 7 และ 8 ตามลำดับ)

4.1.3 การคัดเลือกต้น BC_2F_1-1988 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

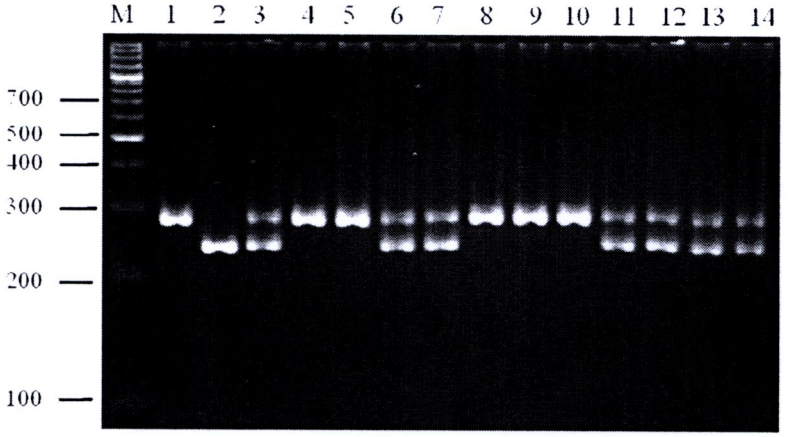
ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 ปลูกเมล็ด BC_2F_1 ของ กข 6 และแปดริ้ว ที่ผลิตได้จากต้น BC_1F_1-1988 ทั้งหมดจำนวน 12 ต้น แล้วคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM10318 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Gn1a* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากทั้งหมด 12 ต้น คัดเลือกได้ 6 ต้น ได้แก่ BC_2F_1-1988-4178 BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4182 BC_2F_1-1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1-1988-4189 ดังภาพ 24



ภาพ 24 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในการคัดเลือกต้น BC_2F_1-1988 เมื่อใช้เครื่องหมาย RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แปดริ้ว และต้น BC_2F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ทั้งหมด 12 ต้น โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ กข 6 เลนที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์แปดริ้ว เลนที่ 3-14 คือ ต้น BC_2F_1-1988-4178 BC_2F_1-1988-4179 BC_2F_1-1988-4180 BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4182 BC_2F_1-1988-4183 BC_2F_1-1988-4184 BC_2F_1-1988-4185 BC_2F_1-1988-4186 BC_2F_1-1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1-1988-4189 คัดเลือกได้ต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือ ต้น BC_2F_1-1988-4178 BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4182 BC_2F_1-1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1-1988-4189 (เลนที่ 3 6 7 12 13 และ 14 ตามลำดับ)

จากนั้นจึงคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM10395 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *SPP1* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัสเช่นเดียวกัน จากทั้งหมด 12 ต้น คัดเลือกได้ 7 ต้น ได้แก่ BC_2F_1-1988-4178 BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4182 BC_2F_1-1988-4186 BC_2F_1-1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1-1988-4189 ดังภาพ 25

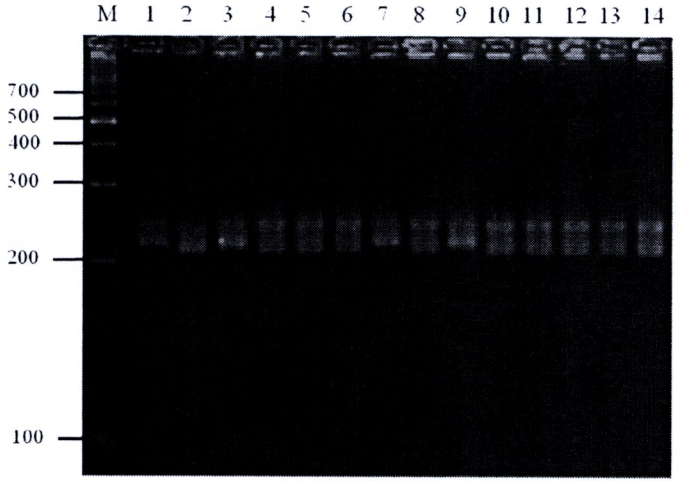


ภาพ 25 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในการคัดเลือกต้น BC_2F_1-1988 เมื่อใช้เครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แปดริ้ว และต้น BC_2F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ทั้งหมด 12 ต้น โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ กข 6 เลนที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์แปดริ้ว เลนที่ 3-14 คือ ต้น BC_2F_1-1988-4178 BC_2F_1-1988-4179 BC_2F_1-1988-4180 BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4182 BC_2F_1-1988-4183 BC_2F_1-1988-4184 BC_2F_1-1988-4185 BC_2F_1-1988-4186 BC_2F_1-1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1-1988-4189 คัดเลือกได้ต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือ ต้น BC_2F_1-1988-4178 BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4182 BC_2F_1-1988-4186 BC_2F_1-1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1- 1988-4189 (เลนที่ 3 6 7 11 12 13 และ 14 ตามลำดับ)

ทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM21335 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Ghd7* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากทั้งหมด 12 ต้น คัดเลือกได้ 9 ต้น ได้แก่ BC_2F_1-1988-4179 BC_2F_1-1988-4180 BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4183 BC_2F_1-1988-4185 BC_2F_1-1988-4186 BC_2F_1-1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1-1988-4189 ดังภาพ 26 คัดเลือกต้น BC_2F_1 ที่มียีนควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงทั้งสามยีน คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ได้จำนวน 4 ต้น ได้แก่ BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1-1988-4189 ซึ่งมีจีโนไทป์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัสเหมือนกันทั้งสามเครื่องหมาย แล้วทำ

การผสมกลับไปหาพันธุ์ กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_1 ได้เมล็ด BC_3F_1 ทั้งหมดจำนวน 35 เมล็ด ขณะเดียวกันคัดเลือกต้น BC_2F_1-1988-4181 ที่ผสมตัวเองได้เมล็ด BC_2F_2 จำนวน 484 เมล็ด เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ในฤดูนาปี พ.ศ. 2553



ภาพ 26 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในการคัดเลือกต้น BC_2F_1-1988 เมื่อใช้เครื่องหมาย RM21335 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 แปดริ้ว และต้น BC_2F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ทั้งหมด 12 ต้น โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ กข 6 เลนที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์แปดริ้ว เลนที่ 3-14 คือ ต้น BC_2F_1-1988-4178 BC_2F_1-1988-4179 BC_2F_1-1988-4180 BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4182 BC_2F_1-1988-4183 BC_2F_1-1988-4184 BC_2F_1-1988-4185 BC_2F_1-1988-4186 BC_2F_1-1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1-1988-4189 คัดเลือกได้ต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือ ต้น BC_2F_1-1988-4179 BC_2F_1-1988-4180 BC_2F_1-1988-4181 BC_2F_1-1988-4183 BC_2F_1-1988-4185 BC_2F_1-1988-4186 BC_2F_1- 1988-4187 BC_2F_1-1988-4188 และ BC_2F_1-1988-4189 (เลนที่ 4 5 6 8 10 11 12 13 และ 14 ตามลำดับ)

4.1.4 การคัดเลือกต้น BC_3F_1-1988-4181 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ในฤดูนาปี พ.ศ. 2553 ทำการปลูกเมล็ด BC_3F_1 ของ กข 6 และแปดริ้ว ที่ผลิตได้จากต้น BC_2F_1-1988-4181 ทั้งหมดจำนวน 17 ต้น แล้วคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM10318 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Gn1a* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากทั้งหมด 17 ต้น คัดเลือกได้ 12 ต้น ได้แก่ BC_3F_1-1988-4181-2776 BC_3F_1-1988-4181-2781 BC_3F_1-1988-4181-2782 BC_3F_1-1988-4181-2786 BC_3F_1-1988-4181-2789 BC_3F_1-1988-4181-2791 BC_3F_1-1988-4181-2792 BC_3F_1-1988-4181-2794 BC_3F_1-1988-4181-2795 BC_3F_1-1988-4181-2799 BC_3F_1-1988-4181-2800 และ BC_3F_1-1988-4181-2801 แล้วจึงคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมาย RM10395 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *SPP1* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัสเช่นเดียวกัน จาก 12 ต้น ที่คัดเลือกได้ด้วยเครื่องหมาย RM10318 คัดเลือกได้ 9 ต้น ได้แก่ BC_3F_1-1988-4181-2786 BC_3F_1-1988-4181-2789 BC_3F_1-1988-4181-2791 BC_3F_1-1988-4181-2792 BC_3F_1-1988-4181-2794 BC_3F_1-1988-4181-2795 BC_3F_1-1988-4181-2799 BC_3F_1-1988-4181-2800 และ BC_3F_1-1988-4181-2801 ต่อมาคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM21335 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Ghd7* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากต้น BC_3F_1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* และ *SPP1* จำนวน 9 ต้น คัดเลือกได้ 5 ต้น ได้แก่ BC_3F_1-1988-4181-2786 BC_3F_1-1988-4181-2794 BC_3F_1-1988-4181-2795 BC_3F_1-1988-4181-2799 และ BC_3F_1-1988-4181-2800 จากผลการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถคัดเลือกต้น BC_3F_1 ที่มียีนควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงทั้งสามยีน คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ได้จำนวน 5 ต้น คือ ต้น BC_3F_1-1988-4181-2786 BC_3F_1-1988-4181-2794 BC_3F_1-1988-4181-2795 BC_3F_1-1988-4181-2799 และ BC_3F_1-1988-4181-2800 แล้วทำการผสมกลับไปหาพันธุ์รับ กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_4F_1 ได้เมล็ด BC_4F_1 รวมทั้งหมดจำนวน 167 เมล็ด ขณะเดียวกันต้น BC_3F_1 ที่ผสมตัวเองได้เมล็ด BC_3F_2 จำนวน 131.75 กรัม

4.1.5 การคัดเลือกต้น BC_4F_1-1988-4181-2786 BC_4F_1-1988-4181-2794 BC_4F_1-1988-4181-2799 และ BC_4F_1-1988-4181-2800 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2554 ปลูกเมล็ด BC_4F_1 ของ กข 6 และแปดริ้ว ที่ผลิตได้จาก BC_3F_1-1988-4181-2786 BC_3F_1-1988-4181-2794 BC_3F_1-1988-4181-2799 และ BC_3F_1-1988-4181-2800 ทั้งหมดจำนวน 24 ต้น แล้วคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM23428 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *WFP* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากทั้งหมด 24 ต้น

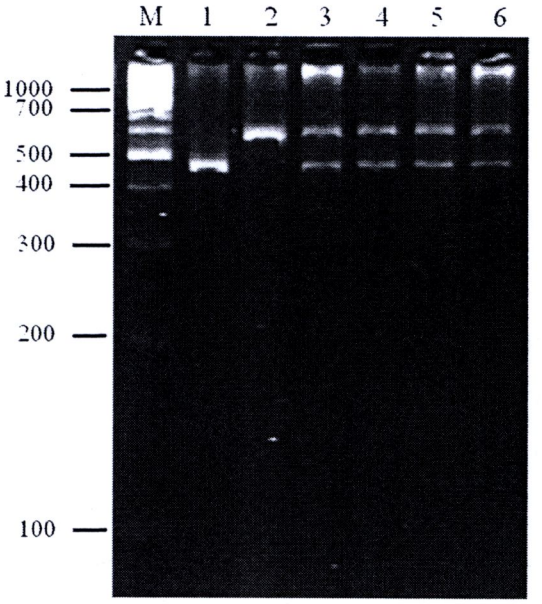
คัดเลือกได้ 14 ต้น ได้แก่ BC_4F_1-1988-4181-2799-4416 BC_4F_1-1988-4181-2799-4417 BC_4F_1-1988-4181-2799-4418 BC_4F_1-1988-4181-2799-4420 BC_4F_1-1988-4181-2799-4421 BC_4F_1-1988-4181-2799-4422 BC_4F_1-1988-4181-2794-4425 BC_4F_1-1988-4181-2794-4426 BC_4F_1-1988-4181-2794-4428 BC_4F_1-1988-4181-2786-4435 BC_4F_1-1988-4181-2786-4440 BC_4F_1-1988-4181-2786-4442 BC_4F_1-1988-4181-2786-4443 และ BC_4F_1-1988-4181-2786-4444 แล้วจึงคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมาย RM10395 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *SPP1* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัสเช่นเดียวกัน จาก 14 ต้น ที่คัดเลือกได้ด้วยเครื่องหมาย RM23428 คัดเลือกได้ 8 ต้น ได้แก่ BC_4F_1-1988-4181-2799-4416 BC_4F_1-1988-4181-2799-4418 BC_4F_1-1988-4181-2794-4426 BC_4F_1-1988-4181-2794-4428 BC_4F_1-1988-4181-2786-4435 BC_4F_1-1988-4181-2786-4440 BC_4F_1-1988-4181-2786-4442 และ BC_4F_1-1988-4181-2786-4443 ต่อมาทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM10318 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Gn1a* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากต้น BC_4F_1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* และ *SPP1* จำนวน 8 ต้น คัดเลือกได้ 7 ต้น ได้แก่ BC_4F_1-1988-4181-2799-4418 BC_4F_1-1988-4181-2794-4426 BC_4F_1-1988-4181-2794-4428 BC_4F_1-1988-4181-2786-4435 BC_4F_1-1988-4181-2786-4440 BC_4F_1-1988-4181-2786-4442 และ BC_4F_1-1988-4181-2786-4443 จากนั้นทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM21335 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Ghd7* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัสเช่นเดียวกัน จากต้น BC_4F_1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* *SPP1* และ *Gn1a* จำนวน 7 ต้น คัดเลือกได้ 5 ต้น ได้แก่ BC_4F_1-1988-4181-2794-4426 BC_4F_1-1988-4181-2794-4428 BC_4F_1-1988-4181-2786-4440 BC_4F_1-1988-4181-2786-4442 และ BC_4F_1-1988-4181-2786-4443

จากผลการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถคัดเลือกต้น BC_4F_1 ที่มียีนควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงทั้งสี่ยีน คือ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ได้จำนวน 5 ต้น ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นทำการผสมตัวเองของต้น BC_4F_1 ดังกล่าวเพื่อผลิตเมล็ด BC_4F_2 สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงได้ต่อไป

4.2 คู่ผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับพันธุ์เมืองไทร

4.2.1 การคัดเลือกต้น F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2552 ทำการผสมพันธุ์ข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร ผลิตเมล็ด F_1 ของชัยนาท 1 และเมืองไทร ได้จำนวน 6 เมล็ด จากนั้นในฤดูนาปี พ.ศ. 2552 ได้ทำการเพาะเมล็ด F_1 ของชัยนาท 1 และเมืองไทร แล้วคัดเลือกต้น F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวต้นเตี้ย กับข้าวพันธุ์เมืองไทรที่เป็นข้าวต้นสูงดังภาพ 27



ภาพ 27 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อใช้เครื่องหมาย Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เมืองไทร และต้น F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ชัยนาท 1 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์เมืองไทร เลนที่ 3-6 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของลูกผสม F_1 ระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ต้นที่ 1-4 ตามลำดับ

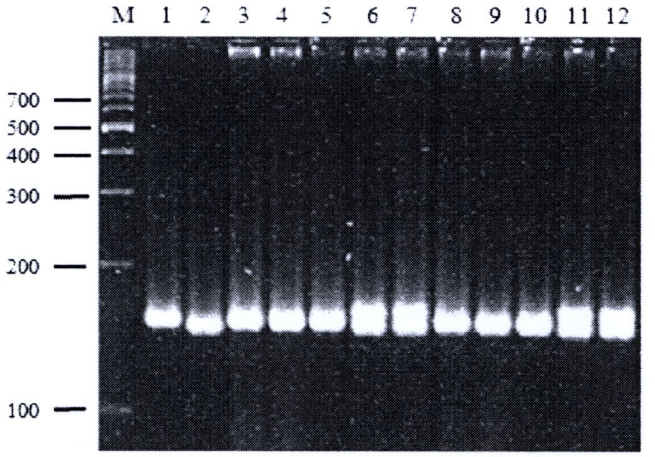
ประกอบกับยังไม่พบเครื่องหมายที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร จากการคัดเลือกได้ต้น F_1 ที่มีแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัส (*Sd1sd1*) จำนวน 4 ต้น จากนั้นนำต้น F_1 ที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1 ได้จำนวน 42 เมล็ด ขณะเดียวกันต้น F_1 ที่ผสมตัวเองได้เมล็ด F_2 จำนวน 113.77 กรัม จากนั้นในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 ทำการสร้างประชากร F_2 ของชัยนาท 1 และเมืองไทร แล้วทำการผสมตัวเองของต้น F_2 ผลิตเมล็ด F_3 ได้จำนวน 200 สายพันธุ์ สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ในฤดูนาปี พ.ศ. 2553

4.2.2 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 ทำการเพาะเมล็ด BC_1F_1 ของชัยนาท 1 และเมืองไทร แล้วคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10316 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Gn1a* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากทั้งหมด 10 ต้น คัดเลือกได้ 4 ต้น ได้แก่ BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 BC_1F_1-4105 และ BC_1F_1-4106 ดังภาพ 28

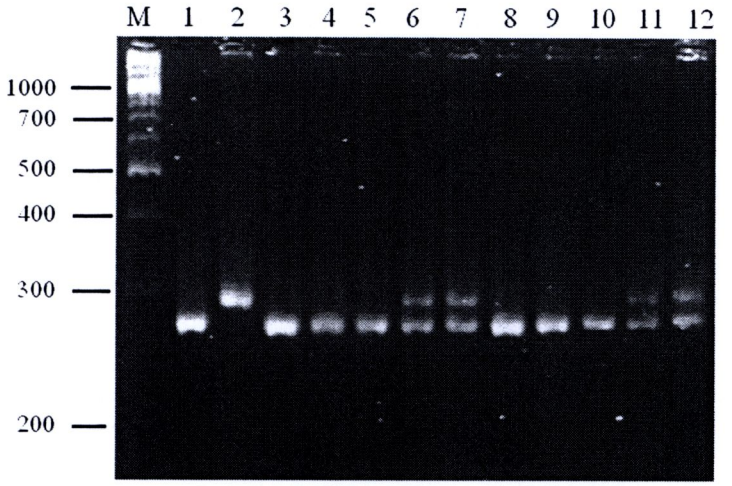
จากนั้นคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM10402 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *SPP1* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัสเช่นเดียวกัน จากทั้งหมด 10 ต้น คัดเลือกได้ 4 ต้น ได้แก่ BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 BC_1F_1-4105 และ BC_1F_1-4106 ดังแสดงในภาพ 29 ซึ่งผลการคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM10316 และ RM10402 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Gn1a* และ *SPP1* ตามลำดับ ให้ผลการคัดเลือกได้ต้น BC_1F_1 เหมือนกัน อาจเนื่องมาจากตำแหน่งของยีนทั้งสองอยู่ใกล้กัน

ลำดับต่อมาคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM21330 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Ghd7* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากทั้งหมด 10 ต้น คัดเลือกได้ 5 ต้น ได้แก่ BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 BC_1F_1-4102 BC_1F_1-4104 และ BC_1F_1-4105 ดังภาพ 30 จากการคัดเลือกต้น BC_1F_1 ที่มียีนควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงทั้งสามยีน คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* จำนวน 3 ต้นได้แก่ BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 และ BC_1F_1-4105 ซึ่งมีจีโนไทป์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัสเหมือนกันทั้งสามเครื่องหมายแล้วทำการผสมกลับไปหาพันธุ์ชัยนาท 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1 ได้เมล็ด BC_2F_1 รวมทั้งหมดจำนวน 21 เมล็ด ขณะเดียวกันคัดเลือกต้น BC_1F_1-4100 ที่ผสมตัวเองได้เมล็ด BC_1F_2 จำนวน 1,260 เมล็ด เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ในฤดูนาปี พ.ศ. 2553



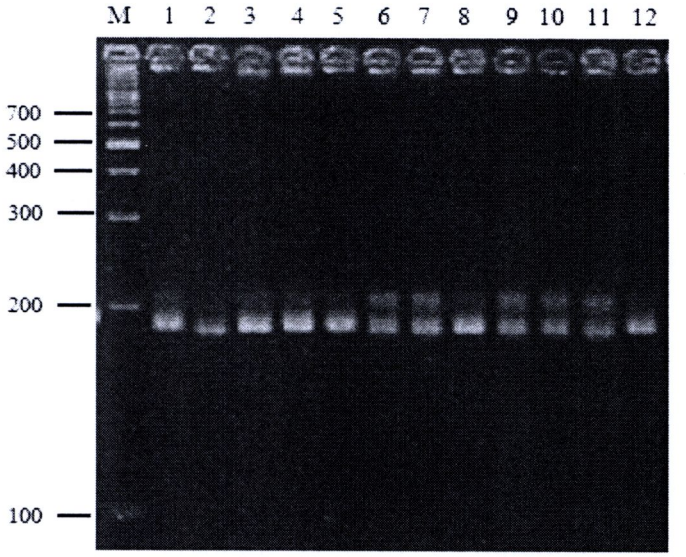
ภาพ 28 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในการคัดเลือกต้น BC_1F_1 เมื่อใช้เครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เมืองไทร และต้น BC_1F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ทั้งหมด 10 ต้น โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ ชัยนาท 1 เลนที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์เมืองไทร เลนที่ 3-12 คือ ต้น BC_1F_1-4096 BC_1F_1-4097 BC_1F_1-4098 BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 BC_1F_1-4101 BC_1F_1-4102 BC_1F_1-4104 BC_1F_1-4105 และ BC_1F_1-4106 คัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือ ต้น BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 BC_1F_1-4105 และ BC_1F_1-4106 (เลนที่ 6 7 11 และ 12 ตามลำดับ)



ภาพ 29 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในการคัดเลือกต้น BC_1F_1 เมื่อใช้เครื่องหมาย RM10402 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เมืองไทร และต้น BC_1F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ทั้งหมด 10 ต้น โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เลนที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์เมืองไทร เลนที่ 3-12 คือ ต้น BC_1F_1-4096 BC_1F_1-4097 BC_1F_1-4098 BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 BC_1F_1-4101 BC_1F_1-4102 BC_1F_1-4104 BC_1F_1-4105 และ BC_1F_1-4106 คัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือ ต้น BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 BC_1F_1-4105 และ BC_1F_1-4106 (เลนที่ 6 7 11 และ 12 ตามลำดับ)



ภาพ 30 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในการคัดเลือกต้น BC_1F_1 เมื่อใช้เครื่องหมาย RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ ชัยนาท 1 เมืองไทร และต้น BC_1F_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ ชัยนาท 1 กับเมืองไทร ทั้งหมด 10 ต้น โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ ชัยนาท 1 เลนที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์เมืองไทร เลนที่ 3-12 คือ ต้น BC_1F_1-4096 BC_1F_1-4097 BC_1F_1-4098 BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 BC_1F_1-4101 BC_1F_1-4102 BC_1F_1-4104 BC_1F_1-4105 และ BC_1F_1-4106 คัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือ ต้น BC_1F_1-4099 BC_1F_1-4100 BC_1F_1-4102 BC_1F_1-4104 และ BC_1F_1-4105 (เลนที่ 6 7 9 10 และ 11 ตามลำดับ)

4.2.3 การคัดเลือกต้น BC_2F_1-4100 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ในฤดูนาปี พ.ศ. 2553 ปลูกเมล็ด BC_2F_1 ของชัยนาท 1 และเมืองไทร ที่ผลิตได้จากต้น BC_1F_1-4100 ทั้งหมด 19 ต้น แล้วคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM10316 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Gn1a* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากทั้งหมด 19 ต้น คัดเลือกได้ 5 ต้น ได้แก่ BC_2F_1-4100-2757 BC_2F_1-4100-2758 BC_2F_1-4100-2759 BC_2F_1-4100-2762 และ BC_2F_1-4100-2767

เมื่อคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM10402 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *SPP1* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัสเช่นเดียวกัน จากทั้งหมด 5 ต้น ที่คัดเลือกได้จากเครื่องหมาย RM10316 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Gn1a* คัดเลือกได้ 4 ต้น ได้แก่ BC_2F_1-4100-2757 BC_2F_1-4100-2759 BC_2F_1-4100-2762 และ BC_2F_1-4100-2767

เมื่อคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM21330 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Ghd7* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากต้น BC_2F_1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* และ *SPP1* จำนวน 4 ต้น คัดเลือกได้จำนวน 4 ต้น ได้แก่ BC_2F_1-4100-2757 BC_2F_1-4100-2759 BC_2F_1-4100-2762 และ BC_2F_1-4100-2767 เช่นเดียวกัน

ดังนั้นสามารถคัดเลือกต้น BC_2F_1 ที่มียีนควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงทั้งสามยีน คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ได้จำนวน 4 ต้น คือ BC_2F_1-4100-2757 BC_2F_1-4100-2759 BC_2F_1-4100-2762 และ BC_2F_1-4100-2767 แล้วทำการผสมกลับไปหาพันธุ์ ชัยนาท 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_1 ได้เมล็ด BC_3F_1 ทั้งหมดจำนวน 68 เมล็ด ขณะเดียวกันต้น BC_2F_1 ที่ผสมตัวเองได้เมล็ด BC_2F_2 จำนวน 64.86 กรัม

4.2.4 การคัดเลือกต้น BC_3F_1-4100-2757 และ BC_3F_1-4100-2762 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2554 ทำการปลูกเมล็ด BC_3F_1 ของชัยนาท 1 กับเมืองไทรที่ผลิตได้จาก BC_2F_1-4100-2757 และ BC_2F_1-4100-2762 ทั้งหมดจำนวน 12 ต้น แล้วคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM10316 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Gn1a* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากทั้งหมด 12 ต้น คัดเลือกได้ 7 ต้น ได้แก่ BC_3F_1-4100-2762-4377 BC_3F_1-4100-2762-4380 BC_3F_1-4100-2757-4391 BC_3F_1-4100-2757-4399 BC_3F_1-4100-2757-4403 BC_3F_1-4100-2757-4404 และ BC_3F_1-4100-2757-4406 แล้วจึงคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมาย RM10402 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *SPP1* พบว่าทั้ง 7 ต้นที่คัดเลือกได้ด้วยเครื่องหมาย RM10316 แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัสเช่นเดียวกัน จากนั้นจึงทำการคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมาย RM21330 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *Ghd7* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากต้น BC_3F_1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* และ *SPP1* จำนวน 7 ต้น คัดเลือกได้ 2 ต้น ได้แก่ BC_3F_1-4100-2762-4377 และ BC_3F_1-4100-2757-4406 แล้วทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย RM23433 ซึ่งเป็น target linked marker กับยีน *WFP* โดยคัดเลือกต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัสเช่นเดียวกัน พบว่า

ต้น BC_3F_1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* จำนวน 2 ต้น นั้นไม่มีต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส จากผลการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถคัดเลือกต้น BC_3F_1 ที่มียีนควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจำนวนสามยีน คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ได้จำนวน 2 ต้น คือ BC_3F_1-4100-2762-4377 และ BC_3F_1-4100-2757-4406 ทำการผสมตัวเองของต้น BC_3F_1-4100-2762-4377 และ BC_3F_1-4100-2757-4406 เพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_2 สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงได้ต่อไป

4.3 การผลิตเมล็ดเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

การผลิตเมล็ดเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ทำการศึกษาโดยใช้เมล็ด F_2 และ BC_2F_2-1988-4181 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว ซึ่งเมล็ด F_2 ที่ผลิตได้ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2552 ได้จากการผสมตัวเองของต้น F_1 ซึ่งคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Glu23 มีจีโนไทป์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ใช้เป็นพันธุ์รับ และข้าวเจ้าพันธุ์แปดริ้วที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ และเมล็ด BC_2F_2-1988-4181 จำนวน 484 เมล็ด ผลิตได้ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 ได้จากการผสมตัวเองของต้น BC_2F_1-1988-4181 ซึ่งคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10318, RM10395 และ RM21335 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ มีจีโนไทป์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัส ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งข้าวพันธุ์รับ กข 6 และข้าวพันธุ์ให้แปดริ้วทั้งสามเครื่องหมาย

สำหรับคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร ใช้เมล็ด F_3 ที่ผลิตได้ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 มีประชากรเริ่มต้น คือต้น F_1 ที่คัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R มีจีโนไทป์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัส ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งพันธุ์รับชัยนาท 1 ที่เป็นข้าวต้นเตี้ย และพันธุ์ให้เมืองไทรที่เป็นข้าวต้นสูง ทำการผสมตัวเองของต้น F_1 ผลิตเมล็ด F_2 จากนั้นทำการผสมตัวเองของต้น F_2 ผลิตเมล็ด F_3 ได้จำนวน 200 สายพันธุ์ สำหรับเมล็ด BC_1F_2-4100 จำนวน 1,260 เมล็ด ที่ผลิตได้ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 ซึ่งได้จากการผสมตัวเองของต้น BC_1F_1-4100 ซึ่งผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10316, RM10402 และ

RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ มีจีโนไทป์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัส ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 และข้าวพันธุ์ให้เมืองไทรทั้งสามเครื่องหมาย สร้างประชากรเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

นำเมล็ด F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้วไปปลูกในฤดูนาปี พ.ศ. 2552 และ BC_2F_2-1988-4181 รวมทั้งเมล็ด F_3 และ BC_1F_2-4100 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทรไปปลูกในฤดูนาปี พ.ศ. 2553 เพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรดังกล่าว

ผลการทดลองที่ 5 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์แปดริ้ว

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 กับจำนวนเมล็ดต่อรวงของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ได้ทำการศึกษาในประชากร F_2 จำนวน 100 กอ ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2552 และประชากร BC_2F_2 จำนวน 122 กอ ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553 ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ โดยข้อมูลฟีโนไทป์ได้จากการนับจำนวนเมล็ดแล้วหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงสำหรับแต่ละต้น และข้อมูลจีโนไทป์ได้จากการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอของประชากรแต่ละต้น เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงแต่ละยีนในการตรวจสอบ เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือไม่ จากการศึกษาดังกล่าวได้ผลการทดลองดังนี้

5.1 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว จำนวน 100 กอ

ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2552 ได้ทำการปลูกประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ได้ต้น F_2 สำหรับการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

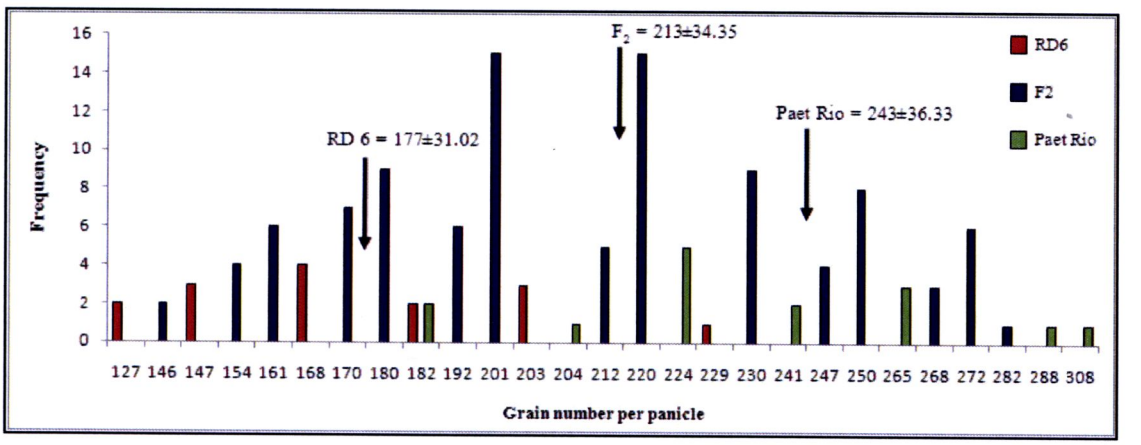
5.1.1 การเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ของแต่ละต้นในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว จำนวน 100 กอ

เก็บข้อมูลฟีโนไทป์โดยทำการสุ่มเก็บรวงข้าวของต้น F_2 ที่มีอัตราการแข่งขันเท่ากัน จำนวน 100 กอ กล่าวคือเก็บตัวอย่างต้น F_2 ที่มีต้น F_2 ต้นอื่นขนาบข้างครบทั้งสี่ด้าน ทำการรวบรวมรวงข้าวทั้งหมดในแต่ละกอ แล้วเก็บรวงข้าวที่อยู่บนตำแหน่งสูงที่สุดของแต่ละกอ จำนวน 5 รวง แยกเก็บแต่ละกอ จำนวน 100 กอ เพื่อเป็นตัวอย่างในการศึกษาข้อมูลฟีโนไทป์ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลฟีโนไทป์โดยนับจำนวนเมล็ดดี และเมล็ดลีบรวมกันทั้งหมด จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงสำหรับแต่ละต้น จากผลการเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ในประชากร F_2 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 213 เมล็ดต่อรวง ขณะที่ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว เท่ากับ 177 และ 243 เมล็ดต่อรวง ดังแสดงในตารางผนวก 1 และ 2 ตามลำดับ (ภาคผนวก ก) เมื่อนำข้อมูลฟีโนไทป์ของตัวอย่างในประชากร F_2 จำนวน 100 กอ มาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยโปรแกรม SAS พบว่า ประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่าง กข 6 กับแปดริ้วนั้นมีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) (P=0.1018) ดังแสดงในภาพ 31 มีค่า skewness ซึ่งอธิบายความเบ้ของกราฟเท่ากับ 0.068 ดังแสดงในตารางผนวก 11 (ภาคผนวก ค) แสดงให้เห็นว่าลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงนี้เป็นลักษณะเชิงปริมาณ มียีนที่ควบคุมหลายตำแหน่ง และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน มีการกระจายตัวของจำนวนเมล็ดต่อรวงอยู่ระหว่าง 145 ถึง 282 เมล็ด ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร F_2 เท่ากับ 213 เมล็ด เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว พบว่าจำนวนเมล็ดต่างกันถึง 66 เมล็ด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.0001) สำหรับผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร F_2 กับข้าวพันธุ์รับ กข 6 เท่ากับ 36 เมล็ด พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) และผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร F_2 กับข้าวพันธุ์ให้ แปดริ้ว เท่ากับ 30 เมล็ด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์รับ กข 6 พันธุ์ให้แปดริ้ว และประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่าง กข 6 กับแปดริ้ว

ประชากร	ค่าพิสัย	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ระยะห่าง	*P*-value
กข 6 (recurrent parent)	126-229	177±31.02	-36	0.0002**
F_2	145-282	213±34.35		
			+30	0.0021**
แปดริ้ว (donor parent)	181-318	243±36.33		

หมายเหตุ ** หมายความว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง



ภาพ 31 การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2552

5.1.2 การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว

ทำการเก็บใบข้าวของต้น F_2 ทั้ง 100 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอดังวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 แต่ละต้น ในการทำพีซีอาร์ใช้เครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.1 โดยยีน *Gn1a* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10318 ยีน *SPP1* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10395 และยีน *Ghd7* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM21335

จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส สำหรับยีน *WFP* นั้นไม่ได้ทำการตรวจสอบในประชากรนี้ เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษายีนดังกล่าวในขณะที่ทำการทดลองนี้ โดยประชากร F_2 จะมีการกระจายตัวของยีนได้จีโนไทป์ 3 แบบ คือ homozygous ของพันธุ์รับ homozygous ของพันธุ์ให้ และ heterozygous

จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *Gn1a* ด้วยเครื่องหมาย RM10318 พบว่าตัวอย่างต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือน กข 6 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 24 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนแปดริ้วมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 30 ต้น และต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้วมีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 46 ต้น ดังภาพผนวก 1 (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 แต่ละต้นด้วยเครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* พบว่าตัวอย่างต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือน กข 6 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 25 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนแปดริ้วมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 29 ต้น และต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 46 ต้น ดังภาพผนวก 2 (ภาคผนวก ข) สำหรับใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 แต่ละต้นด้วยเครื่องหมาย RM21335 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* พบว่าตัวอย่างต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือน กข 6 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 24 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนแปดริ้วมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 24 ต้น และต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 52 ต้น ดังภาพผนวก 3 (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือฟีโนไทป์ และการให้คะแนนจีโนไทป์ของเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ดังแสดงในตารางผนวก 3 (ภาคผนวก ก)

5.1.3 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

ทำการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยใช้ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) และคะแนนจีโนไทป์ที่ได้จากข้อ 5.1.1 และ 5.1.2 ด้วยวิธี single regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือไม่ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 8 ในการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่าเครื่องหมาย RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่ระยะ 84,355 เบส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับจำนวนเมล็ดต่อรวง ค่า R-square เท่ากับ 0.0829 เครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* ที่ระยะ 10,202 เบส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับจำนวนเมล็ดต่อรวง มีค่า R-square เท่ากับ 0.0953 และเครื่องหมาย RM21335 ซึ่งอยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* ที่ระยะ 76,610 เบส นั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับจำนวนเมล็ดต่อรวง ค่า R-square เท่ากับ 0.0830 ซึ่งค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว จำนวน 100 ต้น

Gene	Chromosome	Marker	R-square	*F*-value	*P*-value
Gn1a	1	RM10318	0.0829	4.39	0.0150*
SPP1	1	RM10395	0.0953	5.11	0.0077**
Ghd7	7	RM21335	0.0830	4.39	0.0149*

หมายเหตุ * หมายความว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

** หมายความว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

จากการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว จำนวน 100 ต้น พบว่าแต่ละเครื่องหมายมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง สอดคล้องกับรายงานการศึกษายีน *Gn1a* ที่ทำให้จำนวนเมล็ดข้าวต่อรวงบน

ลำต้นหลัก (main panicle) เพิ่มขึ้น 21% ในข้าวสายพันธุ์คู่แฝดของข้าวพันธุ์ Koshihikari (NIL-*Gn1a*/*Gn1a*) (Ashikari *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษายีน *SPP1* ซึ่งเป็น QTLs หลักของจำนวนดอกข้าวต่อรวง โดยใช้ประชากร F_2 และ F_3 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์รับ Zhenshan 97 (91 ดอกต่อรวง) กับพันธุ์ให้ Teqing (226 ดอกต่อรวง) พบว่ายีน *SPP1* มี dominant effects กับลักษณะจำนวนดอกต่อรวงสูงถึง 51.1% และลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง 24.5% (Liu *et al.*, 2009) รวมถึงรายงานการศึกษายีน *Ghd7* ซึ่งเป็น QTLs ที่ควบคุมลักษณะปริมาณผลผลิต ความสูง และวันออกดอก โดยใช้ประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ Zhenshan 97 กับ Minghui 63 พบว่าอัลลีลของยีน *Ghd7* ที่ได้จากข้าวพันธุ์ Minghui 63 สามารถเพิ่มจำนวนดอกข้าวต่อรวงบนลำต้นหลักได้ 65.8% และให้ผลผลิตข้าวต่อต้นเพิ่มขึ้น 50.9% นอกจากนี้ยังส่งผลให้ต้นข้าวสูงขึ้น 40% และมีวันออกดอกช้าคิดเป็น 33% (Zhang *et al.*, 2009)

5.2 การวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว

ทำการวิเคราะห์หาค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมาย RM10318, RM10395 และ RM21335 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ทั้งหมดที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี multiple-locus regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ทั้งหมดนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด โดยใช้ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) และคะแนนจีโนไทป์ที่ได้จากข้อ 5.1.1 และ 5.1.2 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 8 พบว่าเครื่องหมาย RM10395 ซึ่งอยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* มีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P=0.0018) และมีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0949 ดังแสดงในตารางผนวก 18 (ภาคผนวก ค) เป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว

5.3 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว จำนวน 122 กอ

ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553 ได้ปลูกประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว โดยปลูกเมล็ด BC_2F_2-1988-4181 ซึ่งได้จากการคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10318, RM10395 และ RM21335 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ มีจีโนไทป์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัส ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งข้าวพันธุ์รับ กข 6 และข้าวพันธุ์ให้แปดริ้วทั้งสามเครื่องหมาย แล้วทำการผสมตัวเองของต้น BC_2F_1-1988-4181 ผลิตเมล็ด BC_2F_2-1988-4181 เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

5.3.1 การเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ของแต่ละต้นในประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว จำนวน 122 กอ

เก็บข้อมูลฟีโนไทป์โดยทำการสุ่มเก็บรวงข้าวของต้น BC_2F_2 ที่มีอัตราการแข่งขันเท่ากัน จำนวน 122 กอ กอละ 5-7 รวง ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการเก็บตัวอย่างในประชากร F_2 ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำการนับจำนวนเมล็ดดี และเมล็ดลีบรวมกันทั้งหมด จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงสำหรับแต่ละต้น จากผลการเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ของประชากร BC_2F_2 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 200 เมล็ดต่อรวง ดังภาพ 32 ขณะที่ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว เท่ากับ 184 และ 201 เมล็ดต่อรวง ดังแสดงในตารางผนวก 4 และ 5 ตามลำดับ (ภาคผนวก ก) เมื่อนำข้อมูลฟีโนไทป์ของตัวอย่างในประชากร BC_2F_2 จำนวน 122 ต้น มาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยโปรแกรม SAS พบว่าประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่าง กข 6 กับแปดริ้วนั้นมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ โดยกระจายตัวเบ้ไปทางด้านขวา (P=0.0058) ดังแสดงในภาพ 33 มีค่า skewness ซึ่งอธิบายความเบ้ของกราฟเท่ากับ 0.553 ดังแสดงในตารางผนวก 19 (ภาคผนวก ค) มีการกระจายตัวของจำนวนเมล็ดต่อรวงอยู่ระหว่าง 148 ถึง 280 เมล็ด ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร BC_2F_2 เท่ากับ 200 เมล็ด เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว พบว่าจำนวนเมล็ดต่างกันเพียง 17 เมล็ด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร BC_2F_2 กับพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว เท่ากับ 16 และ 1 เมล็ด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยก็พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน ดังแสดงในตาราง 11

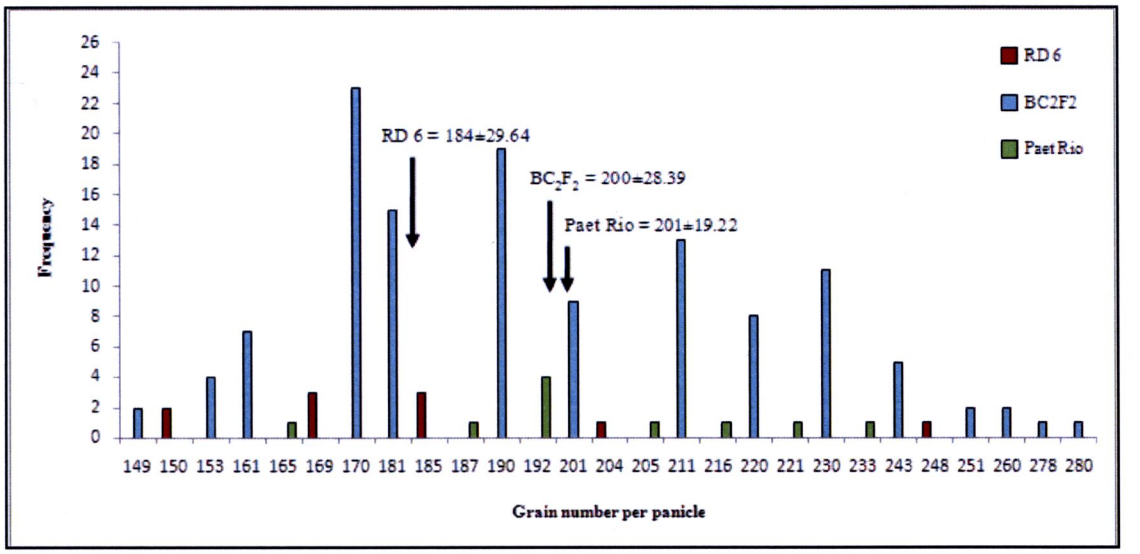
ตาราง 11 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์รับ กข 6 พันธุ์ให้แปดริ้ว และประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่าง กข 6 กับแปดริ้ว

ประชากร	ค่าพิสัย	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ระยะห่าง	*P*-value
กข 6 (recurrent parent)	149-248	184±29.64	-16	0.0905^{ns}
BC_2F_2	148-280	200±28.39		
แปดริ้ว (donor parent)	165-233	201±19.22	+1	0.8758^{ns}

หมายเหตุ ns หมายความว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

(a) **(b)** **(c)**

ภาพ 32 แสดงฟีโนไทป์ของประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว เมื่อ (a) คือ ข้าวพันธุ์ กข 6 (b) คือ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับข้าวพันธุ์แปดริ้ว และ (c) คือ ข้าวพันธุ์แปดริ้ว ตามลำดับ



ภาพ 33 การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553

5.3.2 การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ในประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว

ทำการเก็บใบข้าวของต้น BC_2F_2 ทั้ง 122 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอดังวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร BC_2F_2 แต่ละต้น ในการทำพีซีอาร์ใช้เครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.1 โดยยีน *Gn1a* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10318 ยีน *SPP1* ตรวจสอบด้วยเครื่อง หมาย RM10395 ยีน *Ghd7* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM21335 และยีน *WFP* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM23428 แล้วตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยในประชากร BC_2F_2 นี้ จะมีการกระจายตัวของยีนได้จีโนไทป์ 3 แบบ คือ homozygous ของพันธุ์รับ homozygous ของพันธุ์ให้ และ heterozygous

จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *Gn1a* ด้วยเครื่องหมาย RM10318 พบว่าตัวอย่างต้น BC_2F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือน กข 6 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 34 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนแปดริ้วมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 29 ต้น และต้น BC_2F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้วมีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 59 ต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร BC_2F_2 แต่ละต้นด้วยเครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* พบว่าต้น BC_2F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือน กข 6 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 35 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนแปดริ้วมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 28 ต้น และต้น BC_2F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 59 ต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร BC_2F_2 แต่ละต้นด้วยเครื่องหมาย RM21335 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* พบว่าต้น BC_2F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือน กข 6 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 37 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนแปดริ้ว มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 35 ต้น และต้น BC_2F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 50 ต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร BC_2F_2 แต่ละต้นด้วยเครื่องหมาย RM23428 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* พบว่าตัวอย่างต้น BC_2F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือน กข 6 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 29 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนแปดริ้ว มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 34 ต้น และต้น BC_2F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 59 ต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM23428 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือฟีโนไทป์ และการให้คะแนนจีโนไทป์ของเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ดังแสดงในตารางผนวก 6 (ภาคผนวก ก)

5.3.3 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

ทำการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยใช้ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) และคะแนนจีโนไทป์ที่ได้จากข้อ 5.3.1 และ 5.3.2 ด้วยวิธี single regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7*

และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือไม่ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 8 ในการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่าง กข 6 และแปดริ้ว โดยเครื่องหมาย RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่ระยะ 84,355 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0176 (P=0.3460) เครื่องหมาย RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* ที่ระยะ 10,202 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0122 (P=0.4804) เครื่องหมาย RM21335 ซึ่งอยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* ที่ระยะ 76,610 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0093 (P=0.5731) และเครื่องหมาย RM23428 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* ที่ระยะ 97,813 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0382 (P=0.0982) ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางผนวก 23-26 (ภาคผนวก ค) สรุปได้ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว จำนวน 122 ต้น

Gene	Chromosome	Marker	R-square	*F*-value	*P*-value
Gn1a	1	RM10318	0.0176	1.07	0.3460^{ns}
SPP1	1	RM10395	0.0122	0.74	0.4804^{ns}
Ghd7	7	RM21335	0.0093	0.56	0.5731^{ns}
WFP	8	RM23428	0.0382	2.37	0.0982^{ns}

หมายเหตุ ns หมายความว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้พบว่าค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_2F_2 นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากการหักล้มของต้นข้าวในช่วงเวลาที่ต้นข้าวตั้งท้องดังภาพ 34 เนื่องจากเป็นข้าวพันธุ์ต้นสูงจึงหักล้มง่าย และการหักล้มของข้าวนี้เป็นปัญหาสำคัญในการปลูกข้าวต้นสูง ทำให้เนื้อเยื่อของลำต้นเสียหาย

ส่งผลต่อประสิทธิภาพการลำเลียงไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญ และมีผลต่อปริมาณผลผลิต ทำให้ผลผลิตหรือจำนวนเมล็ดต่อรวงลดลง (Yoshida, 1981) รวมถึงส่งผลกระทบต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงทำให้มีการแสดงออกได้ไม่เต็มที่ แตกต่างกับประชากร F_2 ในฤดูนาปี พ.ศ. 2552 ที่ทำการมัดต้นข้าวแต่ละต้นกับไม้หลักในระยะก่อนข้าวตั้งท้อง จึงไม่ประสบปัญหาการหักล้มของต้นข้าวดังเช่นฤดูนาปี พ.ศ. 2553 ที่ใช้วิธีมัดต้นข้าวรวมกันเพื่อป้องกันการหักล้มของต้นข้าวเท่านั้น

ภาพ 34 การหักล้มของต้นข้าวในประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553

นอกจากนี้ความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแต่ละฤดู สามารถส่งผลให้ยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงบางยีนมีการแสดงออกไม่เต็มที่ หรือไม่มีการแสดงออกเลย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yan และคณะ (2009) ที่กล่าวถึงอิทธิพลของสภาพแวดล้อมต่อการแสดงออกของยีน *Gn1a* กล่าวคือ ข้าวพันธุ์ Habataki ที่ปลูกในประเทศญี่ปุ่น จากรายงานของ Ashikari และคณะ (2005) ได้จำนวนเมล็ดต่อรวงเท่ากับ 306 เมล็ด ขณะที่ปลูกที่ Yangzhou ประเทศจีน ได้จำนวนเมล็ดต่อรวง 200 เมล็ด ซึ่งจำนวนเมล็ดลดลงประมาณ 35% และสอดคล้องกับรายงานของ Kovi และคณะ (2011) ที่รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงหรือความผันผวนของอุณหภูมิ ในแต่ละฤดูของปีส่งผลต่อองค์ประกอบผลผลิตของข้าว โดยทำการศึกษาลักษณะ

จำนวนดอกต่อรวง ความยาวของรวง และความสูงของต้นในปี ค.ศ. 2007 ใช้ประชากร recombinant inbred line ระหว่างข้าวพันธุ์ Zhenshan 95 กับ Zhongzao 18 แบ่งการเพาะกล้าเป็นสามช่วง ได้แก่ ช่วงแรก วันที่ 30 มีนาคม มีอุณหภูมิเฉลี่ยที่ 23 องศาเซลเซียส ช่วงกลาง วันที่ 18 พฤษภาคม มีอุณหภูมิเฉลี่ย 29 องศาเซลเซียส และช่วงปลาย วันที่ 5 กรกฎาคม อุณหภูมิเฉลี่ยที่ 27 องศาเซลเซียส ซึ่งจากรายงานพบว่าช่วงการตอบสนองของแสงไม่มีผลต่อลักษณะที่ศึกษา แต่การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่สูงขึ้นในช่วงกลาง ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยที่ 30 องศาเซลเซียส นั้นมีผลทำให้จำนวนดอกข้าวต่อรวง ความยาวรวง และความสูงเพิ่มขึ้น

5.4 การวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว

ทำการวิเคราะห์หาค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมาย RM10318, RM10395, RM21335 และ RM23428 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ทั้งหมดที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี multiple-locus regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนทั้งหมดนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด โดยใช้ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) และคะแนนจีโนไทป์ที่ได้จากข้อ 5.3.1 และ 5.3.2 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 8 พบว่าเครื่องหมาย RM23428 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* ที่ระยะ 97,813 เบส มีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.0356) และมีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0363 ดังแสดงในตารางผนวก 27 (ภาคผนวก ค) เป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Miura และคณะ (2010) ได้ศึกษาพบว่ายีน *OsSPL14* หรือ *WFP* บนโครโมโซมที่ 8 มีผลต่อการแตกแขนง และเพิ่มปริมาณผลผลิตข้าว จากรายงานการวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนในประชากร BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าว Nipponbare กับข้าวพันธุ์ ST-12 มีจำนวนเมล็ดบนลำต้นหลัก 152 และ 475 เมล็ด มีแขนงที่ 1 บนลำต้นหลัก 10.5 และ 28.9 แขนง ตามลำดับ พบว่าต้นที่ได้รับอัลลีลของยีน *OsSPL14* จากข้าวพันธุ์ ST-12 มีจำนวนเมล็ดบนลำต้นหลักเฉลี่ย 241.6 เมล็ด และมีแขนงที่ 1 เฉลี่ยจำนวน 21.4 แขนง ให้ผลผลิตสูงกว่าข้าว Nipponbare ถึง 52% ซึ่งตรงกับรายงานการศึกษาของ Jioa และคณะ (2010) ที่รายงานการทำงานของยีน *OsSPL14* หรือ *IPA* หรือ *WFP* ที่ควบคุมการแตกแขนงที่ 1 และ 2 ของรวงข้าว โดยสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตข้าวขึ้นได้

10% ในข้าวสายพันธุ์คู่แฝดของข้าวพันธุ์ Xiushui 11 (XS11) ที่ได้รับอัลลีลของยีน *OsSPL14* ที่มีการกลายพันธุ์

จากผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน*Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_2F_2 พบว่าเครื่องหมาย RM23428 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด กล่าวได้ว่าประชากร BC_2F_2 นี้ได้รับยีน *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว เนื่องจากผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร BC_2F_2 (200 เมล็ด) กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว (201 เมล็ด) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าประชากร BC_2F_2 ได้รับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงบางยีนจากพันธุ์ให้แปดริ้ว ทำให้ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร BC_2F_2 เคลื่อนเข้าใกล้ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว ถึงแม้ว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้วจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ รวมถึงค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร BC_2F_2 กับข้าวพันธุ์รับ กข 6 ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติด้วยเช่นกัน ซึ่งมีสาเหตุมาจากการหักล้มของต้นข้าว และอิทธิพลของสภาพแวดล้อมดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

นอกจากนี้ยังพบว่ามีประชากร BC_2F_2 บางสายพันธุ์ที่มีความดีเด่นเหนือกว่าพันธุ์ให้ ดังภาพ 36 กล่าวคือ มีประชากร BC_2F_2 บางสายพันธุ์ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่าข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว จึงควรนำสายพันธุ์ดังกล่าวไปปลูกศึกษาเพิ่มเติมในฤดูถัดไป และป้องกันการหักล้มของต้นข้าว

ผลการทดลองที่ 6 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์เมืองไทร

ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 กับจำนวนเมล็ดต่อรวงของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร โดยทำการศึกษาในประชากร $F_{3:4}$ จำนวน 87 กอ และประชากร BC_1F_2 จำนวน 100 กอ ในฤดูนาปี

(กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553 ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลฟีโนไทป์และจีโนไทป์ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือไม่ จากการศึกษาได้ผลการทดลองดังนี้

6.1 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร จำนวน 87 สายพันธุ์

ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553 ได้ทำการปลูกประชากรลูกผสมชั่วที่ 3 (F_3) ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร จำนวน 100 สายพันธุ์ เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

6.1.1 การเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ของแต่ละต้นในประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทรจำนวน 87 สายพันธุ์

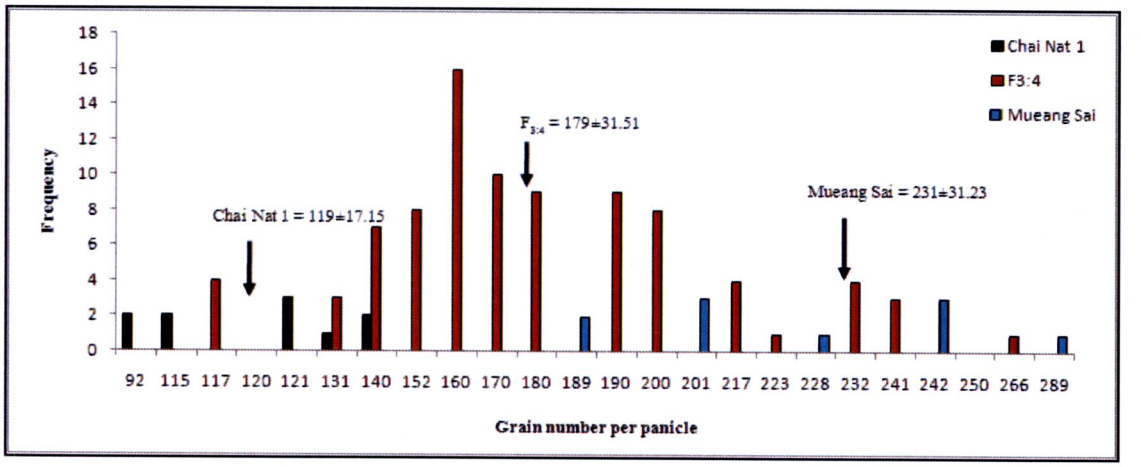
เก็บข้อมูลฟีโนไทป์โดยทำการสุ่มเก็บรวงข้าวของต้น F_3 ที่มีอัตราการแข่งขันเท่ากัน ได้จำนวน 87 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 100 สายพันธุ์ เนื่องจากมีการกระจายตัวของลักษณะความสูงของต้นข้าวในบางสายพันธุ์ ทำให้มีอัตราการแข่งขันไม่เท่ากันจึงไม่เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างสายพันธุ์ละ 5-7 กอ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการเก็บตัวอย่างในประชากร F_2 ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างของแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 1 ต้น เพื่อเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ โดยนับจำนวนเมล็ดดี และเมล็ดลีบรวมกันทั้งหมด จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงสำหรับแต่ละต้น จากผลการเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ได้ค่าเฉลี่ยของประชากร $F_{3:4}$ เท่ากับ 179 เมล็ดต่อรวง ขณะที่ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 และข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร เท่ากับ 119 และ 231 เมล็ด ดังแสดงในตารางผนวก 7 และ 8 ตามลำดับ (ภาคผนวก ก) เมื่อนำข้อมูลฟีโนไทป์ของตัวอย่างในประชากร $F_{3:4}$ จำนวน 87 ต้น มาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยโปรแกรม SAS พบว่า ประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 1 กับเมืองไทรนั้นมีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) (P=0.2321) ดังแสดงในภาพ 35 มีค่า skewness ซึ่งอธิบายความเบ้ของกราฟเท่ากับ 0.361 ดังแสดงในตารางผนวก 28 (ภาคผนวก ค) มีการกระจายตัวของจำนวนเมล็ดต่อรวงอยู่ระหว่าง 116 ถึง 266 เมล็ด ค่าเฉลี่ย

จำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร F_4 เท่ากับ 179 เมล็ด เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร พบว่ามีจำนวนเมล็ดต่างกันถึง 112 เมล็ด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.0001) ผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร $F_{3:4}$ กับข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 เท่ากับ 60 เมล็ด เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) และผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร $F_{3:4}$ กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร เท่ากับ 52 เมล็ด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 พันธุ์ให้เมืองไทร และประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 1 กับเมืองไทร

ประชากร	ค่าพิสัย	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ระยะห่าง	*P*-value
ชัยนาท 1 (recurrent parent)	92-142	119±17.15	-60	<0.0001**
$F_{3:4}$	116-266	179±31.51		
			+52	<0.0001**
เมืองไทร (donor parent)	189-289	231±31.23		

หมายเหตุ ** หมายความว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง



ภาพ 35 การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทรในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553

6.1.2 การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ในประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวของประชากร F_4 โดยทำการแกะเปลือกเมล็ดข้าวของตัวอย่างเมล็ดแต่ละสายพันธุ์ทั้งหมด 87 สายพันธุ์ ใช้เมล็ดจำนวน 7 เมล็ด ต่อสายพันธุ์มาทำการสกัดดีเอ็นเอดังวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร $F_{3:4}$ แต่ละต้น ในการทำพีซีอาร์ใช้เครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.2 โดยยีน *Gn1a* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10316 ยีน *SPP1* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10402 ยีน *Ghd7* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM21330 และยีน *WFP* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM23433 แล้วตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยในประชากร $F_{3:4}$ นี้ จะมีการกระจายตัวของยีนได้จีโนไทป์ 3 แบบ คือ homozygous ของพันธุ์รับ homozygous ของพันธุ์ให้ และ heterozygous

จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *Gn1a* ด้วยเครื่องหมาย RM10316 พบว่าตัวอย่างต้น $F_{3:4}$ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนชัยนาท 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 42 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 26 ต้น และต้น $F_{3:4}$ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 จำนวน 19 ต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร $F_{3:4}$ แต่ละต้น ด้วยเครื่องหมาย RM10402 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* พบว่าตัวอย่างต้น $F_{3:4}$ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนชัยนาท 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 39 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 27 ต้น และต้น $F_{3:4}$ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 21 ต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10402 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร $F_{3:4}$ แต่ละต้น ด้วยเครื่องหมาย RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* พบว่าตัวอย่างต้น $F_{3:4}$ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนชัยนาท 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 35 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือน

เมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 32 ต้น และต้น $F_{3:4}$ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 20 ต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร $F_{3:4}$ แต่ละต้น ด้วยเครื่องหมาย RM23433 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* พบว่าตัวอย่างต้น $F_{3:4}$ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนชัยนาท 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 33 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 31 ต้น และต้น $F_{3:4}$ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 23 ต้น สำหรับใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM23433 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือฟีโนไทป์ และการให้คะแนนจีโนไทป์ของเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ดังแสดงในตารางผนวก 9 (ภาคผนวก ก)

6.1.3 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

ทำการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยใช้ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) และคะแนนจีโนไทป์ที่ได้จากข้อ 6.1.1 และ 6.1.2 ด้วยวิธี single regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือไม่ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 8 ในการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร โดยเครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่ระยะ 11,819 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0294 (P=0.2857) เครื่องหมาย RM10402 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* ที่ระยะ 62,830 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0227 (P=0.3807) เครื่องหมาย RM21330 ซึ่งยึดติดกับยีน *Ghd7* ที่ระยะ 294,497 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0448 (P=0.1460) และเครื่องหมาย RM23433 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* ที่ระยะ 97,813 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0084 (P=0.7018) ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางผนวก 32-35 (ภาคผนวก ค) สรุปได้ดังแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร จำนวน 87 ต้น

Gene	Chromosome	Marker	R-square	*F*-value	*P*-value
Gn1a	1	RM10316	0.0294	1.27	0.2857^{ns}
SPP1	1	RM10402	0.0227	0.98	0.3807^{ns}
Ghd7	7	RM21330	0.0448	1.97	0.1460^{ns}
WFP	8	RM23433	0.0084	0.36	0.7018^{ns}

หมายเหตุ ns หมายความว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

6.2 การวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร

ทำการวิเคราะห์หาค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมาย RM10316, RM10402, RM21330 และ RM23433 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ทั้งหมดที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี multiple-locus regression ซึ่งใช้หลักการเดียวกับ composite interval mapping เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนทั้งหมดนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด โดยใช้ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) และคะแนนจีโนไทป์ที่ได้จากข้อ 6.1.1 และ 6.1.2 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 8 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$

สันนิษฐานว่าอาจมียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงยีนอื่นๆ ที่มีส่วนส่งเสริมการแสดงออกของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในข้าวพันธุ์เมืองไทรแต่ยังไม่สามารถตรวจพบได้ แม้ว่าจะใช้วิธี composite interval mapping ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนมาใช้ในการวิเคราะห์แล้วก็ตาม

อีกสาเหตุหนึ่งที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ เนื่องจากในประชากร $F_{3:4}$ แต่ละสายพันธุ์นั้นมีการกระจายตัวของลักษณะความสูงของต้นข้าว และอายุออกดอก ดังภาพ 36 และ 37 ซึ่งการกระจายตัวของลักษณะดังกล่าวในประชากร $F_{3:4}$ เกิดจากความแตกต่างกันของลักษณะความสูง และอายุออกดอกระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 ที่มีความสูง 113 เซนติเมตร ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุออกดอกสั้น 110 วัน กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทรที่เป็นข้าวต้นสูง มีความสูง 166 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง มีอายุออกดอก 145 วัน จึงกล่าวได้ว่าความแปรปรวนจากการกระจายตัวของลักษณะความสูงของต้นข้าว และอายุออกดอก ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง กล่าวคือ การกระจายตัวของลักษณะความสูงของต้นข้าว ทำให้มีทั้งข้าวต้นสูง และต้นเตี้ยในแต่ละสายพันธุ์ ถึงแม้ว่าจะจัดกลุ่มความสูงของประชากร F_3 ในขั้นตอนการวางแผนปลูกแล้วก็ตามแต่ก็ยังมีการกระจายตัวของลักษณะดังกล่าวในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งข้าวต้นสูงจะบดบังแสงทำให้ข้าวต้นเตี้ยไม่สามารถสร้างอาหารได้เต็มที่ ส่งผลต่อการพัฒนารวงข้าว และจำนวนเมล็ดต่อรวง นอกจากนี้ความแปรปรวนที่เกิดจากการกระจายตัวของอายุออกดอกก็มีอิทธิพลต่อจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยเช่นกัน กล่าวคือ ข้าวที่มีอายุออกดอกเร็วจะมีช่วงระยะเวลาการพัฒนารวงน้อยทำให้มีแนวโน้มรวงข้าวสั้น มีเมล็ดต่อรวงน้อย ขณะที่ข้าวที่มีอายุออกดอกยาวจะมีแนวโน้มความยาวรวงมากกว่า ซึ่งความยาวรวงนั้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ดังนั้นความแปรปรวนที่เกิดจากการกระจายตัวของลักษณะความสูง และอายุออกดอกจึงมีผลกระทบโดยตรงต่อการแสดงออกของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$

ภาพ 36 แสดงการกระจายตัวของลักษณะความสูงของต้นข้าวในประชากร $F_{3:4}$ แต่ละสายพันธุ์ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทรในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553

ภาพ 37 แสดงการกระจายตัวของลักษณะอายุออกดอกของต้นข้าวในประชากร $F_{3:4}$ แต่ละสายพันธุ์ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทรในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553

6.3 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร จำนวน 100 กอ

ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553 ได้ปลูกประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร โดยปลูกเมล็ด BC_1F_2-4100 ซึ่งได้จากการคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10316, RM10402 และ RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ มีจีโนไทป์เป็นแบบเฮทเทอโรไซกัส ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 และข้าวพันธุ์ให้เมืองไทรทั้งสามเครื่องหมาย แล้วทำการผสมตัวเองของต้น BC_1F_1-4100 ผลิตเมล็ด BC_1F_2-4100 เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

6.3.1 การเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ของแต่ละต้นในประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร จำนวน 100 กอ

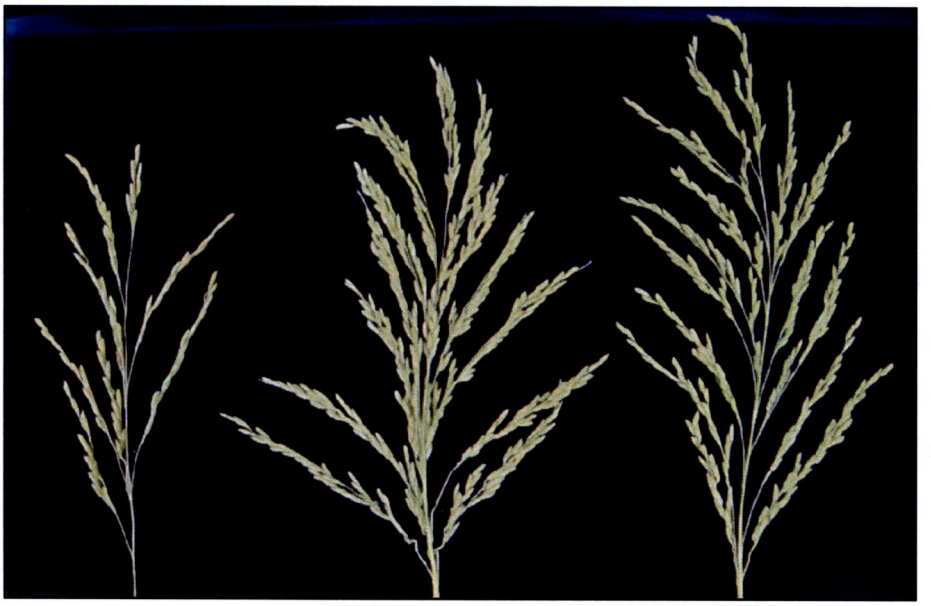
เก็บข้อมูลฟีโนไทป์โดยทำการสุ่มเก็บรวงข้าวของต้น BC_1F_2 ที่มีอัตราการแข่งขันเท่ากัน จำนวน 100 กอ กล่าวคือเก็บตัวอย่างต้น BC_1F_2 ที่มีต้น BC_1F_2 ต้นอื่นขนาบข้างครบทั้งสี่ด้าน ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการเก็บตัวอย่างในประชากร F_2 ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำการนับจำนวนเมล็ดดี และเมล็ดลีบรวมกันทั้งหมด จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงสำหรับแต่ละต้น จากผลการเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ได้ค่าเฉลี่ยของประชากร BC_1F_2 เท่ากับ 141 เมล็ดต่อรวง ดังภาพ 38 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 และพันธุ์ให้เมืองไทร เท่ากับ 119 และ 231 เมล็ดต่อรวง ดังแสดงในตารางผนวก 7 และ 8 ตามลำดับ (ภาคผนวก ก) เมื่อนำข้อมูลฟีโนไทป์ของตัวอย่างในประชากร BC_1F_2 จำนวน 100 ต้น มาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยโปรแกรม SAS พบว่า ประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 1 กับเมืองไทรนั้นมีการกระจายตัวแบบปกติ (P=0.7379) ดังแสดงในภาพ 39 ค่า skewness ซึ่งอธิบายความเบ้ของกราฟเท่ากับ 0.177 ดังแสดงในตารางผนวก 37 (ภาคผนวก ค) มีการกระจายตัวของจำนวนเมล็ดต่อรวงอยู่ระหว่าง 98 ถึง 193 เมล็ด ค่าเฉลี่ยของประชากร BC_1F_2 เท่ากับ 141 เมล็ด เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร พบว่ามีจำนวนเมล็ดต่างกันถึง 112 เมล็ด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.0001) ผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร BC_1F_2 กับข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 เท่ากับ 22 เมล็ด เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) และผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร BC_1F_2

กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร เท่ากับ 90 เมล็ด มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตาราง 15

ตาราง 15 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 พันธุ์ให้เมืองไทร และประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 1 กับเมืองไทร

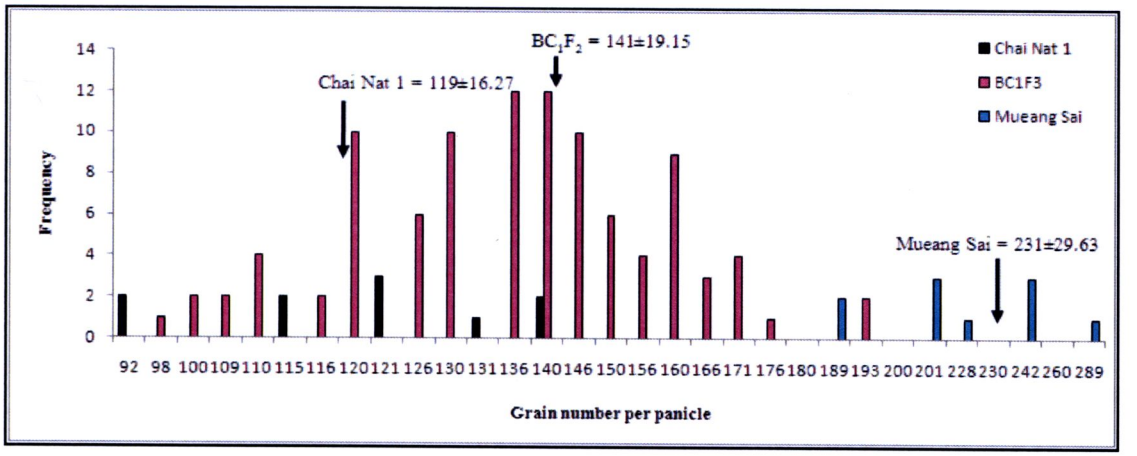
ประชากร	ค่าพิสัย	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ระยะห่าง	*P*-value
ชัยนาท 1 (recurrent parent)	92-142	119±17.15	-22	0.0010**
BC_1F_2	98-193	141±19.15		
			+90	<0.0001**
เมืองไทร (donor parent)	189-289	231±31.23		

หมายเหตุ ** หมายความว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง



(a) **(b)** **(c)**

ภาพ 38 แสดงฟีโนไทป์ของประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร เมื่อ (a) คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (b) คือ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์เมืองไทร และ (c) คือ ข้าวพันธุ์เมืองไทร



ภาพ 39 การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทรในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553

6.3.2 การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ในประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร

ทำการเก็บใบข้าวของต้น BC_1F_2 ทั้ง 100 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอดังวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร BC_1F_2 แต่ละต้น ในการทำพีซีอาร์ใช้เครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.2 โดยยีน *Gn1a* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10316 ยีน *SPP1* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10402 ยีน *Ghd7* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM21330 แล้วตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยในประชากร BC_1F_2 นี้จะมีการกระจายตัวของยีนได้จีโนไทป์ 3 แบบ คือ homozygous ของพันธุ์รับ homozygous ของพันธุ์ให้ และ heterozygous สำหรับยีน *WFP* นั้นไม่ได้ทำการตรวจสอบในประชากรนี้ เนื่องจากทำการตรวจสอบในประชากร $F_{3:4}$ ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจึงตัดสินใจไม่ทำการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM23433 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* ในประชากร BC_1F_2 นี้

จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของจีโนไทป์ของประชากร BC_1F_2 แต่ละต้นด้วยเครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนยีน *Gn1a* พบว่าตัวอย่างต้น BC_1F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนชัยนาท 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 26 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนเมืองไทร มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มี

จำนวน 21 ต้น และต้น BC_1F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 53 ต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร BC_1F_2 แต่ละต้นด้วยเครื่องหมาย RM10402 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* พบว่าตัวอย่างต้น BC_1F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนชัยนาท 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 21 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 24 ต้น และต้น BC_1F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 55 ต้น สำหรับใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10402 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร BC_1F_2 แต่ละต้นด้วยเครื่องหมาย RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* พบว่าตัวอย่างต้น BC_1F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนชัยนาท 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 มีจำนวน 19 ต้น แถบดีเอ็นเอเหมือนเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 มีจำนวน 19 ต้น และต้น BC_1F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทรมีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 มีจำนวน 61 ต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือฟีโนไทป์ และการให้คะแนนจีโนไทป์ของเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ดังแสดงในตารางผนวก 10 (ภาคผนวก ก)

6.3.3 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

ทำการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยใช้ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) และคะแนนจีโนไทป์ที่ได้จากข้อ 6.3.1 และ 6.3.2 ด้วยวิธี single regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือไม่ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 8 ในการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงใน

ประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร โดยเครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่ระยะ 11,819 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0436 (P=0.1150) เครื่องหมาย RM10402 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* ที่ระยะ 62,830 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0077 (P=0.6865) และเครื่องหมาย RM21330 ซึ่งอยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* ที่ระยะ 294,497 เบส มีค่า R-square เท่ากับ 0.0313 (P=0.2140) ซึ่งผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางผนวก 40-42 (ภาคผนวก ค) สรุปได้ดังตาราง 16

ตาราง 16 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร จำนวน 100 ต้น

Gene	Chromosome	Marker	R-square	*F*-value	*P*-value
Gn1a	1	RM10316	0.0436	2.21	0.1150^{ns}
SPP1	1	RM10402	0.0077	0.38	0.6865^{ns}
Ghd7	7	RM21330	0.0313	1.57	0.2140^{ns}

หมายเหตุ ns หมายความว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

6.4 การวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับเมืองไทร

ทำการวิเคราะห์หาค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมาย RM10316, RM10402 และ RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ทั้งหมดที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี multiple-locus regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนทั้งหมดนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด โดยใช้ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) และคะแนนจีโนไทป์ที่ได้จากข้อ 6.3.1 และ 6.3.2 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 8 พบว่าเครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่ระยะ 11,819 เบส มีความสัมพันธ์กับ

ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.0453) และมีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0403

จากผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_1F_2 พบว่าเครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* มีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด กล่าวได้ว่าประชากร BC_1F_2 นี้ได้รับยีน *Gn1a* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร เนื่องจากเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร BC_1F_2 (141 เมล็ด) กับข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 (119 เมล็ด) พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P=0.001) แสดงให้เห็นว่าประชากร BC_1F_2 ได้รับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงบางยีนจากพันธุ์ให้เมืองไทร ทำให้ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร BC_1F_2 มากกว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในขณะที่ผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร BC_1F_2 (141 เมล็ด) กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร (231 เมล็ด) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.0001) เช่นเดียวกัน ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจมียีนตำแหน่งอื่นในข้าวพันธุ์ให้เมืองไทรที่มีอิทธิพลต่อลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงทำให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้นำมาใช้ในการตรวจสอบ และศึกษาความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 1 กับเมืองไทร และถึงแม้ว่าจะตรวจพบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* แต่อิทธิพลของยีนดังกล่าวมีผลต่อลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อย หรืออาจเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มยีนรอง (minor QTL) เนื่องจากค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร BC_1F_2 คือ 141 เมล็ด มีค่าแตกต่างจากค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 คือ 119 เมล็ด และค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร BC_1F_2 ยังต่างจากค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของพันธุ์ให้เมืองไทรถึง 90 เมล็ด

ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี single regression แล้วปรากฏว่าไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_1F_2 แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี multiple-locus regression ซึ่งมีหลักการเดียวกับ composite interval mapping สามารถตรวจพบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ได้ สอดคล้องกับรายงานของ Nagabhushana และคณะ (2006) ซึ่งได้ศึกษา และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ QTL ของลักษณะการเจริญ และปริมาณผลผลิตของข้าวด้วยวิธี simple interval mapping (SIM) ซึ่งมีหลักการเดียวกับ single regression และ composite interval mapping (CIM) ที่มีหลักการเดียวกับ

multiple-locus regression พบว่าการวิเคราะห์วันออกดอก (days to flowering) ด้วยวิธี SIM ไม่สามารถตรวจพบ QTL ได้ แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี CIM สามารถตรวจพบ 1 QTL บนโครโมโซมที่ 3 และเมื่อวิเคราะห์ลักษณะปริมาณผลผลิต (grain yield) ด้วยวิธี SIM ตรวจพบเพียง 2 QTL บนโครโมโซมที่ 6 และ 8 ในขณะที่วิเคราะห์ด้วยวิธี CIM สามารถตรวจพบ 3 QTL บนโครโมโซมที่ 3 6 และ 8 ซึ่งจากรายงานสรุปได้ว่าการวิเคราะห์ QTL ด้วยวิธี CIM นั้นมีประสิทธิภาพ และความไวในการตรวจพบมากกว่าวิธี SIM เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี CIM จะรวมความแปรปรวนที่เกิดจาก QTL อื่นๆ มาวิเคราะห์ร่วมด้วย ในขณะที่การวิเคราะห์ด้วยวิธี SIM ใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTL ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เท่านั้น จึงมีประสิทธิภาพ และขอบเขตในการตรวจพบน้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี CIM

สาเหตุที่พบเครื่องหมายโมเลกุล RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร BC_1F_2 ต่างจากประชากร $F_{3:4}$ ที่ไม่พบความสัมพันธ์นั้นเพราะประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 1 กับเมืองไทรเป็นข้าวต้นเตี้ยทั้งหมด มีอายุออกดอกใกล้เคียงกัน ดังภาพ 40 จึงไม่มีอิทธิพลจากการหักล้มของต้นข้าวรวมถึงความแปรปรวนจากอายุออกดอกที่แตกต่างกันมาเกี่ยวข้องกับจำนวนเมล็ดต่อรวง การแสดงออกของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงใน ประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 1 กับเมืองไทรนี้จึงได้รับอิทธิพลจากการทำงานของยีนเท่านั้น ดังนั้นจึงควรค้นหา และศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงตำแหน่งอื่นๆ เพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีเมล็ดต่อรวงมากได้ต่อไป

ภาพ 40 แสดงลักษณะความสูง และอายุออกดอกของต้นข้าวในประชากร BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 1 กับเมืองไทร ในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553