วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นในประชากร F_2 ของพันธุ์ข้าว กข79 กับสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม

Development of molecular markers associated with early heading date in F_2 populations of RD79 rice variety and RD43 fragrant glutinous rice line

ปฐมพร อินชนบท[1]*, ยุพเยาว์ คบพิมาย[1], กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง[2] และ วราภรณ์ แสงทอง[1]*

Patomporn Inchonbot[1]*, Yuppayao Kophimai[1], Krisana Lanumteang[2] and Varaporn Sangtong[1]*

[1] *สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่* 50290
[1] *Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand*
[2] *สาขาวิชาสถิติและการจัดการสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่* 50290
[2] *Program in Statistics and Information Management, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand*

บทคัดย่อ: อายุวันออกดอกของข้าวเป็นลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญสำหรับการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ซึ่งมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตข้าว อายุวันออกดอกเป็นลักษณะเชิงปริมาณที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลโดยเฉพาะความยาวของช่วงแสง ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นในประชากร F_2 คู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข79 (พันธุ์แม่) กับสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม ที่มีอายุวันออกดอกสั้น (พันธุ์พ่อ) ศึกษาทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น โดยนำข้าวพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อไปอ่านลำดับดีเอ็นเอทั้งจีโนม (whole genome sequencing; WGS) เพื่อมาวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ (SNPs) และ อินเดล (InDel) ที่แตกต่างกันภายในเอ็กซอนของยีนที่ควบคุมอายุวันออกดอกสั้น และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งของยีนและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับข้าวพันธุ์พ่อได้ชัดเจน แล้วนำเครื่องหมายโมเลกุลไปหาความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นของประชากร F_2 ในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ผลจากการวิเคราะห์สมการถดถอยเชิงเดียว จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *Hd5* มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นมากที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 50.94% ในสภาพวันยาว และ 54.81% ในสภาพวันสั้น และจากการวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับอายุวันออกดอกสั้น พบว่า การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *Hd5* ร่วมกับ *RFT1* มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นมากที่สุด โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 76.51% ในสภาพวันยาว และ 68.25% ในสภาพวันสั้น ซึ่งสามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประชากรนี้ให้มีอายุวันออกดอกสั้นต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ
คำสำคัญ: ข้าว; เครื่องหมายโมเลกุล; อายุวันออกดอกสั้น; สภาพวันยาว; สภาพวันสั้น

ABSTRACT: The heading date of rice is a significant agricultural characteristic affecting its adaptation to the environment, with direct implications for both quantity and quality of rice yield. The heading date is a quantitative trait controlled by multiple gene pairs and is influenced by the environment, especially the length of the photoperiod. The purpose of this research was to develop molecular markers associated with an early heading date in the F_2 population resulting from the cross between the RD79 rice variety (female parent) and the RD43 fragrant glutinous rice line with an early heading date (male parent), studying both in natural long-day (NLD) and natural short-day (NSD) conditions. The female and male parent rice cultivars were analyzed using whole genome

* Corresponding author: patompornin01@gmail.com, varapornsangtong@yahoo.com
Received: date; September 4, 2023 Revised: date; January 20, 2024
Accepted: date; January 31, 2024 Published: date;

sequencing (WGS) to analyze and identify variations in single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertion/deletion (InDel) positions within the exons of genes controlling the early heading date. Subsequently, molecular markers were developed, which are associated with specific gene regions and enabling clear distinction between the female and male parents. Molecular markers were subsequently employed to establish a correlation with the early heading date of the F_2 population under NLD and NSD. Through simple regression analysis, it was observed that the genotypes of molecular markers located at the *Hd5* gene exhibited the highest relationship with the early heading date, achieving the coefficient of determination (R-squared; R^2) value of 50.94% in NLD and 54.81% in NSD. Furthermore, a multiple regression analysis was conducted to examine the relationship between molecular markers and the early heading date, it was found that the model incorporated the use of molecular markers located within specific gene regions of *Hd5* and *RFT1* genes. The combined model exhibited the most substantial association with the early heading date, yielding R^2 values of 76.51% in NLD and 68.25% in NSD. These findings hold significant potential for improving rice cultivation within this population to achieve an early heading date.
Keywords: rice; molecular markers; early heading date; natural long-day; natural short-day

บทนำ

ข้าวจัดอยู่ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเป็นสินค้าเกษตรหลักในการส่งออกของประเทศไทย และเป็นพืชเกษตรหลักที่ใช้บริโภคภายในประเทศ ครอบคลุมพื้นที่เพาะปลูกมากที่สุด คิดเป็น 43.70% ของพื้นที่การเกษตรทั้งหมดของประเทศ และมีจำนวนครัวเรือนมากถึง 5.1 ล้านครัวเรือน คิดเป็น 63.60% ของจำนวนครัวเรือนภาคเกษตรทั้งหมด (ชัยวัฒน์, 2566) โดยในช่วงหลายปีที่ผ่านมาการส่งออกข้าวไทยประสบปัญหาจากการที่ตลาดผู้นำเข้าข้าวรายใหญ่ หันไปนิยมข้าวขาวพื้นนุ่มจากประเทศคู่แข่งมากขึ้น (ประชาชาติธุรกิจ, 2564) เนื่องจากเป็นข้าวที่มีคุณภาพดี ราคาไม่แพง เป็นเกรดรองลงมาจากข้าวพื้นนุ่มหอมอย่างข้าวหอมมะลิที่มีราคาสูง ดังนั้นเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค การพัฒนาข้าวขาวพื้นนุ่มเพื่อการส่งออก ในราคาที่ไม่แพง เป็นทางเลือกให้กับผู้บริโภคมากขึ้นและเป็นการยกระดับข้าวไทยสู่ตลาดข้าวคุณภาพมากขึ้น (การเงินธนาคาร, 2563)

ปัจจุบันพันธุ์ของข้าวพื้นนุ่มที่โดดเด่นและได้มีการรับรองพันธุ์ คือ กข79 ได้รับรองพันธุ์เมื่อวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2562 เป็นพันธุ์ข้าวที่ช่วยตอบโจทย์ความต้องการด้านตลาดภายในประเทศและต่างประเทศที่ต้องการข้าวพื้นนุ่ม (ฐานเศรษฐกิจ, 2563) แต่จากการปลูกในหลายพื้นที่พบว่าข้าว กข79 เมื่อปลูกในช่วงเดือนเมษายนและพฤษภาคม ซึ่งเป็นสภาพวันยาวมีอายุเก็บเกี่ยวที่ยาวนานประมาณ 135-140 วัน แต่เมื่อปลูกในเดือนพฤศจิกายนที่เป็นสภาพวันสั้น พบว่า อายุเก็บเกี่ยวข้าวลดลงอยู่ที่อายุ 110 วัน (ฐานเศรษฐกิจ, 2562) จะเห็นได้ว่าอายุเก็บเกี่ยวของข้าว กข79 ไม่มีความสม่ำเสมอกันในแต่ละฤดู ขึ้นอยู่กับความยาวของช่วงแสง ซึ่งในปัจจุบันเกษตรกรมีความต้องการข้าวที่มีอายุเก็บเกี่ยวสั้นทั้งในฤดูนาปรัง (สภาพวันยาว) และนาปี (สภาพวันสั้น) สามารถให้ผลผลิตสูงและตรงต่อความต้องการของผู้บริโภคและส่งออกข้าว ทำให้การวิจัยและพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวอายุเก็บเกี่ยวสั้น จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตข้าวในอนาคตได้ (กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2563)

อายุวันออกดอกของข้าวถือเป็นลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในการปรับตัวให้อยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆ โดย Vergara and Chang (1985) ได้จำแนกข้าวตามความไวต่อช่วงแสง เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ Photoperiod non-sensitive เป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง โดยข้าวมีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นโดยช่วงแสงไม่มีอิทธิพลที่แตกต่างกัน และมีระยะการตอบสนองต่อช่วงแสงและกระตุ้นให้เกิดการออกดอกที่สั้นมาก (น้อยกว่า 30 วัน) กลุ่มที่ 2 คือ Weakly photoperiod sensitive เป็นข้าวที่มีการเจริญทางลำต้นยาวนานขึ้นเมื่อได้รับช่วงแสงที่ยาวมากกว่า 12 ชม.ต่อวัน มีระยะการตอบสนองต่อช่วงแสงและกระตุ้นให้เกิดการออกดอกมากกว่า 30 วัน โดยสามารถกำเนิดช่อดอกภายใต้สภาพวันยาวได้ และกลุ่มที่ 3 คือ Strongly photoperiod sensitive เป็นข้าวไวต่อช่วงแสง โดยข้าวที่มีการเจริญทางลำต้นต่อไปเรื่อย ๆ และไม่มีการกำเนิดช่อดอกเมื่อได้รับช่วงแสงที่ยาวกว่าช่วงวันวิกฤติ ซึ่งเป็นความยาวของช่วงกลางวันที่มีผลต่อการออกดอกของข้าวเรียกว่า ช่วงวันวิกฤติ

เนื่องจากลักษณะอายุวันออกดอกของข้าวเป็นลักษณะเชิงปริมาณนอกจากจะถูกควบคุมด้วยสภาพแวดล้อมแล้วยังถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ซึ่งในปัจจุบันมีการค้นพบยีนกว่า 125 ยีน (Lee and An, 2015) โดยจากการศึกษายีนที่มีความสัมพันธ์ในการควบคุม

อายุวันออกดอกของข้าวจำนวนมาก พบว่า ยีน *Heading date 3a* (*Hd3a*) และยีน *FLOWERING LOCUS T 1* (*RFT1*) เป็นยีนสร้างสารฟอริเจน (florigens) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการออกดอกของข้าว ทำให้เกิดการเปลี่ยนจากระยะการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น เข้าสู่ระยะการสืบพันธุ์ หรือการสร้างช่อดอกของข้าว (Komiya et al., 2008) ซึ่งทั้งสองยีนอยู่ห่างกัน 11.5 kb บนโครโมโซม 6 และมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกัน 91% จึงทำหน้าที่ในการชักนำการออกดอกของข้าวเช่นเดียวกัน (Kojima et al., 2002) จากการทดลองของ Komiya et al. (2008) ได้ใช้เทคนิค RNA interference (RNAi) ในการสร้างสายพันธุ์ข้าว เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *Hd3a* และ *RFT1* พบว่า เมื่อสร้างสายพันธุ์ข้าวอยู่ในสภาพที่เป็น *Hd3a* RNAi และ *RFT1* RNAi ซึ่งเป็นการปิดการแสดงออกของยีนทั้งสอง สายพันธุ์ข้าวเหล่านี้ไม่สามารถออกดอกได้ถึงแม้จะมีอายุข้าวมากถึง 300 วัน ในขณะที่การทำให้ยีนทั้งสองมีการแสดงออกได้มาก (overexpression) ช่วยชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นเนื้อเยื่อเจริญดอกได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาพวันสั้นสายพันธุ์ข้าวที่ปิดการแสดงออกของยีน *Hd3a* (*Hd3a* RNAi) จะออกดอกช้าประมาณ 1 เดือน เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ข้าวที่เป็น *RFT1* RNAi และ Wild type ตรงกันข้ามกับในสภาพวันยาว พบว่า สายพันธุ์ข้าวที่ปิดการแสดงออกของยีน *RFT1* (*RFT1* RNAi) จะออกดอกช้ามากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ข้าวที่เป็น *Hd3a* RNAi และ Wild type (Komiya et al., 2009) ชี้ให้เห็นว่ายีน *Hd3a* และ *RFT1* มีความสำคัญมากในการออกดอกของข้าว ซึ่งยีน *Hd3a* มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการออกดอกของข้าวในสภาพวันสั้น ส่วนยีน *RFT1* มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการออกดอกของข้าวในสภาพวันยาว (Tsuji et al., 2008) การศึกษายีน *Hd3a* ยังพบว่าถูกควบคุมด้วยยีน *Heading date 1* (*Hd1*) เป็นทรานสคริบชั่นแฟกเตอร์ (transcription factor; TF) ที่จับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *Hd3a* (Hayama et al., 2003) หน้าที่ของยีน *Hd1* เป็นได้ทั้งยีนที่ช่วยกระตุ้นและยับยั้งการออกดอกของข้าวขึ้นอยู่กับความยาวของช่วงแสง (Lin et al., 2000) โดยในสภาพวันสั้นจะกระตุ้นให้เกิดการออกดอก และจะยับยั้งการออกดอกในสภาพวันยาว (Yano et al., 2000) นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *Early heading date 1* (*Ehd1*) จะช่วยส่งเสริมการทำงานของยีน *Hd3a* และ *RFT1* ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น (Doi et al., 2004) โดยจากการสร้างสายพันธุ์ข้าวด้วยเทคนิค RNAi ในการปิดการแสดงออกของยีน *Ehd1* ทำให้ข้าวออกดอกช้าลง 7 วัน ภายใต้สภาพวันสั้น (Kim et al., 2007) และ 10 วัน ภายใต้สภาพวันยาว (Ryu et al., 2009)

การยับยั้งการออกดอกของข้าวที่จำเพาะในสภาพวันยาวยังเกี่ยวข้องกับ 3 ยีนหลัก ได้แก่ ยีน *Heading date 4* (*Hd4*)/ *Grain yield and heading date 7* (*Ghd7*), ยีน *Heading date 5* (*Hd5*)/ *Grain yield and heading date 8* (*Ghd8*) และยีน *Heading date 2* (*Hd2*) โดยยีนเหล่านี้จะยับยั้งการทำงานหรือการแสดงออกของยีน *Ehd1* ที่เป็นยีนส่งเสริมการทำงานของยีน *Hd3a* และ *RFT1* ในสภาพวันวันยาว (Lin et al., 2000; Wei et al., 2010; Xue et al., 2008) จากการศึกษาประชากร F_2 ของข้าว Hayamasari กับ Hoshinoyume พบว่ายีน *Hd5* ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 8 แปลรหัสได้เป็นโปรตีน HAP3 ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ CCAAT-box-binding TF โดยโปรตีน HAP จะประกอบไปด้วย HAP2, HAP3 และ HAP5 ร่วมกันเป็น trimeric complexes จับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *Hd3a* (Nonoue et al., 2008; Wei et al., 2010; Laloum et al., 2013) และจากการศึกษาอายุวันออกดอกของข้าว Kitaibuki และ Hoshinoyume ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า มียีนเดียวที่เกี่ยวข้องกับอายุวันออกดอกคือยีน *Hd5* โดยข้าว Kitaibuki มียีน *hd5* ที่ไม่ทำงานเกิดจากการขาดหายไป 19 เบส ซึ่งเหมือนกับข้าว Hayamasari เป็นสาเหตุทำให้อายุวันออกดอกสั้นกว่าข้าว Hoshinoyume ที่มียีน *Hd5* ที่ทำงาน (Fujino et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาพวันยาวยีน *Hd5* ทำให้ข้าวออกดอกช้าขึ้น โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Ehd1, Hd3a* และ *RFT1* (Wei et al., 2010) แต่ในสภาพวันสั้นยีน *Hd5* ไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนเหล่านี้ ซึ่งจากการศึกษายีน *Hd5* ที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าการสูญเสียการทำงานของยีน *hd5* ทำให้ข้าวมีอายุวันออกดอกสั้นลง

ปัจจุบันมีการสร้างองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านจีโนม ซึ่งนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการค้นหายีนที่สำคัญในข้าว และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ควบคุมลักษณะสำคัญต่างๆ มาช่วยในการคัดเลือกให้มีความแม่นยำมากขึ้นและลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วกว่าวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าววิธีแบบดั้งเดิม (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

แห่งชาติ, 2564) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นในประชากร F_2 ของ กข79 (พันธุ์แม่) กับ สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม (พันธุ์พ่อ) โดยใช้เทคโนโลยีอ่านลำดับดีเอ็นเอทั้งจีโนม (whole genome sequencing; WGS) ที่ได้จากข้าวพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ ในการออกแบบเครื่องหมายที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น

วิธีการศึกษา

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ข้าวพันธุ์ กข79 หรือ ชัยนาท 62 ใช้เป็นพันธุ์แม่ เป็นพันธุ์ข้าวเจ้าพื้นนุ่ม ต้นเตี้ย ไม่ไวต่อช่วงแสง ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่าง PSL00034-37-3-1-3 ต้านทานต่อโรคไหม้เป็นพันธุ์แม่ กับ PSBRc20 ต้านทานต่อโรคไหม้และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นพันธุ์พ่อ ที่ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท

สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม ใช้เป็นพันธุ์พ่อ ให้ยีนอายุวันออกดอกสั้น เป็นข้าวเหนียวสีขาว มีกลิ่นหอม ต้นเตี้ย ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีอายุออกดอกสั้น เป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์ของหน่วยความเป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ซึ่งเป็นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้า กข43 ให้เป็นข้าวเหนียว ที่มีกลิ่นหอม

ประชากร F_2 เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ข้าว กข79 (พันธุ์แม่) กับสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม (พันธุ์พ่อ)

การปลูกศึกษาและการเก็บข้อมูลลักษณะอายุวันออกดอก

การปลูกศึกษา ณ แปลงนาทดลองของหน่วยความเป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 2 ฤดู ได้แก่ ฤดูนาปรัง 2564 เป็นการศึกษาในสภาพวันยาว (natural long-day, NLD) เริ่มเพาะวันที่ 3 เมษายน พ.ศ. 2564 จนถึงเก็บเกี่ยวในปลายเดือน สิงหาคม พ.ศ. 2564 (ช่วงแสงมากกว่า 12.00 ชม.ต่อวันโดยเฉลี่ย) และฤดูนาปี 2564 เป็นการศึกษาในสภาพวันสั้น (natural short-day, NSD) เริ่มเพาะวันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2564 จนถึงเก็บเกี่ยวในปลายเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2564 (ช่วงแสงน้อยกว่า 12.00 ชม.ต่อวันโดยเฉลี่ย) ข้อมูลความยาวช่วงแสงรวบรวมมาจากสมาคมดาราศาสตร์ไทย (https://thaiastro.nectec.or.th/skyevnt/sunmoon/2022/chiangmai.html) โดยหลังจากเพาะกล้าข้าวได้อายุ 30 วัน ทำการถอนและปักดำในระยะ 25 × 25 ซม. ต่อแถว แถวยาว 5 เมตร การดูแลใส่ปุ๋ยเคมีจำนวน 4 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 หลังปักดำ 7 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 จำนวน 25 กก./ไร่ ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 ใส่หลังปักดำ 14 วัน และ 30 วันตามลำดับ ใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 จำนวน 12.5 กก./ไร่ ผสมกับปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 จำนวน 6.5 กก./ไร่ และครั้งที่ 4 หลังปักดำ 45 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 จำนวน 6.5 กก./ไร่ ผสมกับปุ๋ยเคมีสูตร 0-0-60 จำนวน 5 กก./ไร่ โดยปริมาณ ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส : โพแทสเซียม ทั้งหมดเท่ากับ 17 : 8 : 11 กก./ไร่ ตามลำดับ มีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงตามความจำเป็น การเก็บข้อมูลอายุวันออกดอก (ฟีโนไทป์) ของแต่ละต้นในประชากร F_2 โดยเริ่มนับวันตั้งแต่วันเพาะจนถึงวันที่เริ่มออกดอก เมื่อรวงแรกโผล่พ้นออกจากต้น 50% ซึ่งพันธุ์แม่ และพันธุ์พ่อ เก็บข้อมูลอายุวันออกดอก พันธุ์ละ 30 ต้น ส่วนประชากร F_2 สุ่มตัวอย่างเก็บข้อมูลอายุวันออกจาก 8 แถวที่ปลูกติดกันได้จำนวน 147 ต้น ในสภาพวันยาว และ 138 ต้น ในสภาพวันสั้น เมื่อเมล็ดบนต้น F_2 สุกแก่เก็บเมล็ด (เมล็ด F_3) ของแต่ละต้นมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ต่อไป

การส่งอ่านลำดับดีเอ็นเอทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ และการวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ (single nucleotide polymorphisms) และ อินเดล (insertion/deletion) ของยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น

การส่งอ่านลำดับดีเอ็นเอทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่ คือ กข79 และข้าวพันธุ์พ่อ คือ สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม โดยเพาะต้นกล้าจากเมล็ดข้าวเปลือก เมื่อข้าวอายุได้ 15-20 วัน เก็บตัวอย่างใบข้าวจำนวน 50-100 ต้นต่อพันธุ์ มาสกัดสารพันธุกรรมหรือจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA purification kit Cat no.K0512 ของบริษัท Thermo Scientific™ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Fermentas จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างส่งให้บริษัท Novogene Biotech ประเทศจีน โดยทางบริษัทจะส่งผลการอ่านลำดับดีเอ็นเอทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ ที่ผ่านกระบวนการกรองเฉพาะตำแหน่งซึ่งมีความแตกต่างจากลำดับเบสบนจีโนมอ้างอิง คือ Nipponbare (variant calling) และพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ (genome analysis

toolkit, GATK) ในรูปแบบไฟล์ Microsoft Excel ซึ่งจะถูกแยกไฟล์เป็นความแปรผันทางพันธุกรรมแบบสนิปส์ และการเปลี่ยนแปลงแบบอินเดล โดยการวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ และ อินเดล ของยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น จำนวน 7 ยีนที่สนใจ ได้แก่ ยีน *Hd1* (Os06g0275000), *Hd2* (Os07g0695100), *Hd4* (Os07g0261200), *Hd5* (Os08g0174500), *RFT1* (Os06g0157500), *Hd3a* (Os06g0157700) *และ Ehd1* (Os10g0463400)

เมื่อได้ผลวิเคราะห์ WGS ของข้าวพันธุ์แม่ (กข79) และพันธุ์พ่อ (สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม) ทำการวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล โดยเปรียบเทียบกับตำแหน่ง Locus ID ของยีน *Hd1, Hd2, Hd4, Hd5, RFT1, Hd3a* และ *Ehd1* ของข้าวพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ การทำนายผลวิเคราะห์ GATK ตำแหน่งรหัสหรือเอ็กซอน (exon) ที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในรูปแบบต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนได้ จำนวน 4 แบบ ดังนี้ แบบที่ 1 คือ Nonsynonymous เป็นการแทนที่คู่เบสแล้วส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปจากปกติ แบบที่ 2 คือ Stop-gain เป็นการแทนที่คู่เบสแล้วส่งผลให้เกิดรหัสหยุด (stop codon) ทำให้กรดอะมิโนสั้นกว่าปกติ แบบที่ 3 คือ Stop-loss เป็นการแทนที่คู่เบสบริเวณรหัสหยุดแล้วส่งผลให้สูญเสียรหัสหยุดจากตำแหน่งปกติทำให้กรดอะมิโนยาวกว่าปกติ และแบบที่ 4 คือ Frameshift เป็นการเพิ่มขึ้น (insertion) หรือลดลง (deletion) ของเบสตั้งแต่ 1 เบส แล้วส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปจากปกติ ณ ตั้งแต่ลำดับเบสนั้น โดยการเปลี่ยนแปลงรูปแบบดังกล่าวมีผลกระทบต่อกรดอะมิโน และอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ศึกษา และการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล

หลังจากวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ที่ต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ จากการทำนายผลวิเคราะห์ GATK ตำแหน่งเอ็กซอน ของยีนที่ควบคุมอายุวันออกดอกสั้นที่สนใจ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งดังกล่าวมีผลกระทบต่อกรดอะมิโนและอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ทำการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดล (InDel markers) ที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น โดยใช้การเทียบลำดับเบส (alignment) ของข้าวพันธุ์ กข79 กับสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม ในตำแหน่งยีนที่สนใจด้วยโปรแกรม Clustalx 2.1 และออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลในเว็บไซต์ Primer3 (v. 0.4.0) (https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) และ Primer-BLAST ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลชนิดลำดับซ้ำแบบง่ายหรือเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat or SSR markers) ได้จากเว็บไซต์ The Rice Annotation Project (RAP) (https://rapdb.dna.affrc.go.jp/) ที่มีพันธุกรรมข้าวพันธุ์ Nipponbare เป็นต้นแบบฐานพันธุกรรม

การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น ที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ และการนำไปใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากร F_2

สกัดดีเอ็นเอจาก 6 เมล็ดข้าวเปลือกของข้าวพันธุ์แม่ คือ กข79 ข้าวพันธุ์พ่อ คือ สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอพืชสำเร็จรูป Genomic DNA purification kit (Thermo Scientific™, Lithuania) แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โดยมีดีเอ็นเอของพันธุ์ กข79 และสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม เป็นแม่พิมพ์ในการทำพีซีอาร์ และดีเอ็นเอผสมของ กข79 และสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม ซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ 96 well Thermal cycler (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) จีโนมิกดีเอ็นเอประมาณ 50 นาโนกรัม ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.6 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ระยะที่ 1 Pre-Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C ระยะเวลา 2 นาที ระยะที่ 2 Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C ระยะเวลา 0.5 นาที ระยะที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 53-59 °C (อุณหภูมิ Annealing ที่ใช้ขึ้นอยู่กับแต่ละเครื่องหมายโมเลกุล) ระยะเวลา 0.5 นาที ระยะที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C ระยะเวลา 0.5 นาที โดยทำซ้ำจากระยะที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และระยะ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C ระยะเวลา 5 นาที

วิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis) โดยผสมสารสีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (INTRON Biotecnology, Korea) ลงในสารละลายเจลเข้มข้น 4% ก่อนเทเจล จากนั้นอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรสในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 1-3 ชม.

เมื่อครบเวลาทำการบันทึกภาพด้วยเครื่อง Molecular Imager®Gel Doc™ XR+System (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟท์แวร์ Image Lab™ Software (บริษัท BIO-RAD Laboratory) จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic band pattern) ระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ

เมื่อตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อได้ นำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไปตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากร F_2 ในสภาพวันยาว จำนวน 147 ต้น และประชากร F_2 ในสภาพวันสั้น จำนวน 138 ต้น โดยกำหนดให้จีโนไทป์แบบ Homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ คือ กข79 ให้สัญลักษณ์ RR ให้คะแนนเป็น 0, จีโนไทป์แบบ Homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ คือ สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม ให้สัญลักษณ์ DD ให้คะแนนเป็น 2 และจีโนไทป์แบบ Heterozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบเหมือนกับพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ ใช้สัญลักษณ์ RD ให้คะแนนเป็น 1

การวิเคราะห์ทางสถิติ

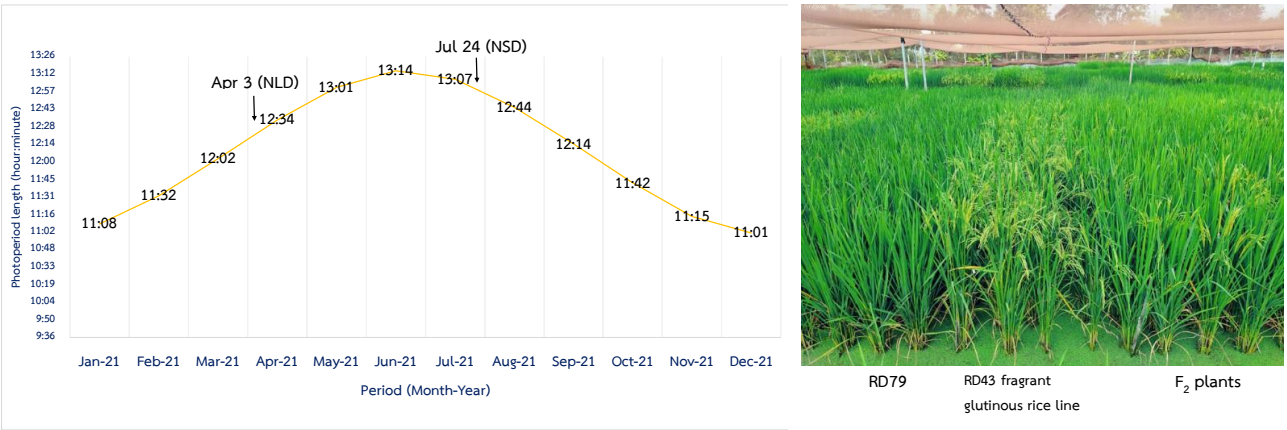
การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม R 4.2.1 โดยการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยฟีโนไทป์ (อายุวันออกดอก) ในกลุ่มของข้าวพันธุ์แม่ พันธุ์พ่อ และประชากร F_2 ในกรณีที่เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกระหว่าง 2 พันธุ์ ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกด้วยวิธี Two independent T-test กรณีที่เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมากกว่า 2 พันธุ์ ทดสอบด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (one-way ANOVA; CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่แบบ Least Significant Difference (LSD) ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่แบบ LSD เป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอกของประชากร F_2 ซึ่งถูกจำแนกตามจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล หากพบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแสดงว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอก จากนั้นทดสอบระดับและทิศทางของความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 ด้วยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ลำดับที่ของสเปียร์แมน (Spearman rank correlation coefficient) โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ซึ่งจะมีค่าอยู่ระหว่าง -1.0 จนถึง +1.0 โดยหากพบว่าค่า r เข้าใกล้ -1.0 หมายความว่าตัวแปรทั้งสองตัวมีความสัมพันธ์กันในเชิงลบหรือตรงกันข้าม แต่หากค่า r มีค่าเข้าใกล้ +1.0 หมายความว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์ไปในเชิงบวกหรือทิศทางเดียวกัน แต่ถ้าตัวแปรทั้งสองมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0 หมายความว่าตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน (สมถวิล, 2565) และในการอธิบายหรือทำนายอายุวันออกดอก จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) ด้วยการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) โดยวิธีการถดถอยเชิงเดียว (simple regression) จากสมการถดถอยเชิงเดียว คือ $\hat{y} = a + bx$ เมื่อกำหนดให้ $\hat{y}$ คือ ค่าประมาณหรือค่าทำนายอายุวันออกดอก, x คือ ค่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล, a คือ ค่าคงที่ของสมการถดถอย โดยที่ a จะเป็นจุดตัด (intercept) แกน y ของสมการ, b คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ x โดยที่ค่า b จะแสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าตัวแปร x ต่อค่า $\hat{y}$ ดังนี้ คือ ถ้าค่า x (จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล) เปลี่ยนไป 1 อัลลีล จะทำให้ค่า $\hat{y}$ (อายุวันออกดอก) เปลี่ยนไป b วัน และการถดถอยพหุคูณ (multiple regression) ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลมากกว่าหนึ่งเครื่องหมายกับอายุวันออกดอก โดยใช้การเลือกตัวแปรโดยวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน (stepwise regression) จากสมการถดถอยพหุคูณ คือ $\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \ldots + b_kx_k$ เมื่อกำหนดให้ $\hat{y}$ คือ ค่าประมาณหรือค่าทำนายอายุวันออกดอก โดยที่ b_0 คือ ค่าคงที่ของสมการถดถอย ส่วน x_1 x_2 และ x_k คือ ค่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลตัวที่ 1 ตัวที่ 2 และ ตัวที่ k ตามลำดับ และ b_1 b_2 และ b_k คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ x_1 x_2 และ x_k ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้นว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่ ด้วยการทดสอบไคสแควร์ (chi-square) โดยมีสมมติฐานอัตราส่วนการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากร F_2 เท่ากับ 1RR : 2RD : 1DD ซึ่งเมื่อค่าไคสแควร์ของเครื่องหมายโมเลกุลน้อยกว่าค่าไคสแควร์ในตารางที่ค่า df = 2 ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ 5.991 และค่า p-value มากกว่า 0.05 แสดงว่าการถ่ายทอดของเครื่องหมายโมเลกุลเป็นไปตามสมมติฐาน

ผลการศึกษา

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (อายุวันออกดอก) ของข้าวพันธุ์แม่ ข้าวพันธุ์พ่อ และประชากร F_2 ในสภาพวันยาว และสภาพวันสั้น

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (อายุวันออกดอก) ของข้าวพันธุ์แม่ ข้าวพันธุ์พ่อ และประชากร F_2 โดยการเก็บข้อมูลอายุวันออกดอกของแต่ละต้นซึ่งเริ่มนับวันตั้งแต่วันเพาะจนถึงวันที่เริ่มออกดอก (เมื่อรวงแรกโผล่พ้นออกจากต้น 50%) ศึกษาทั้งในสภาพวันยาว (ช่วงแสงประมาณ 12.34 ถึง 13.14 ชม.ต่อวัน) และสภาพวันสั้น (ช่วงแสงประมาณ 11.15 ถึง 12.44 ชม.ต่อวัน) (**Figure 1a**) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกทางสถิติด้วย T- test ระหว่างข้าวพันธุ์แม่ คือ กข79 (จำนวน 30 ต้น) และข้าวพันธุ์พ่อ คือ สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม (จำนวน 30 ต้น) พบว่า ค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น โดยในสภาพวันยาวค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม เท่ากับ 80.20 ± 2.12 วัน สั้นกว่าพันธุ์ กข79 ที่มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกเท่ากับ 122.63 ± 0.67 วัน อยู่ประมาณ 40 วัน (**Figure 1b**) และในสภาพวันสั้นค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม เท่ากับ 76.67 ± 2.06 วัน สั้นกว่าพันธุ์ กข79 ที่มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกเท่ากับ 103.70 ± 0.95 วัน อยู่ประมาณ 25 วัน (**Table 1**) ส่วนค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของประชากร F_2 ในสภาพวันยาว จากการสุ่มตัวอย่างจำนวน 147 ต้น พบว่า มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกเท่ากับ 101.80 ± 11.51 วัน (อายุออกดอกสั้นที่สุดและช้าที่สุด เท่ากับ 78 และ 129 วัน ตามลำดับ) ส่วนประชากร F_2 ในสภาพวันสั้น จากการสุ่มตัวอย่างจำนวน 138 ต้น พบว่า มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกเท่ากับ 93.87 ± 6.73 วัน (อายุออกดอกสั้นที่สุดและช้าที่สุด เท่ากับ 78 และ 106 วัน ตามลำดับ) ซึ่งค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของประชากร F_2 ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้นจะมีค่าใกล้เคียงกับกึ่งกลางระหว่างค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของข้าวพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอกระหว่างพันธุ์ กข79, สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม และประชากร F_2 ตัวอย่างที่สุ่มมา ในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ด้วยวิธี ANOVA และจัดกลุ่มด้วยวิธี LSD พบว่า ค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ได้แก่ ค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของพันธุ์ กข79 เป็นกลุ่มที่ 1 (a) ประชากร F_2 เป็นกลุ่มที่ 2 (b) และค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม เป็นกลุ่มที่ 3 (c) (**Table 1**) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้นแตกต่างกันประมาณ 3.53 วัน ในขณะที่พันธุ์ กข79 มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้นแตกต่างกัน ประมาณ 18.93 วัน



(a) (b)

Figure 1 The study involves phenotypic characterization of the heading date. (a) Photoperiod lengths (in hours) for Natural Long-Day (NLD) and Natural Short-Day (NSD) conditions. Information adapted from the Thai Astronomical Society. (b) Comparing the heading date among RD79 rice variety, RD43 fragrant glutinous rice line, and F_2 progenies under Natural Long-Day (NLD) conditions.

Table 1 Comparing the means of heading dates among the female parent, male parent, and F_2 progenies growing under natural long-day and natural short-day conditions using ANOVA followed by the LSD test

Treatment	No. of plants	Heading date (days)					p-value
		Min	Median	Max	Mean	SD	
RD79 (NLD)	30	122	123	124	122.63[a]	0.67	
F_2 progenies (NLD)	147	78	100	129	101.80[b]	11.51	0.000[**]
RD43 line (NLD)	30	76	80	86	80.20[c]	2.12	
RD79 (NSD)	30	101	104	105	103.70[a]	0.95	
F_2 progenies (NSD)	138	78	94	106	93.87[b]	6.73	0.000[**]
RD43 line (NSD)	30	75	76	82	76.67[c]	2.06	

[**]Significant at $p < 0.01$, RD79: Female parent, RD43 line: RD43 fragrant glutinous rice line (male parent), F_2 progenies: F_2 progenies of RD79 rice variety and RD43 fragrant glutinous rice line, NLD: Natural long-day, NSD: Natural short-day, SD: Standard deviation, Means with the same letter are not significantly different from each other ($p < 0.01$ ANOVA followed by LSD test).

การวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ที่ต่างกันภายในยีนที่ควบคุมอายุวันออกดอกสั้น ของข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ และการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น

ผลการวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล จากการทำนายผลวิเคราะห์ GATK ตำแหน่งเอ็กซอน ของยีน *Hd1, Hd2, Hd4, Hd5, RFT1, Hd3a* และ *Ehd1* พบว่า ยีนที่มีตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ที่ต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งดังกล่าวมีผลกระทบต่อกรดอะมิโน และอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ได้แก่ ยีน *Hd1, Hd5, RFT1* และ *Hd3a* (**Table 2**) โดยยีน *Hd1* พบตำแหน่ง Frameshift deletion จำนวน 2 ตำแหน่ง และตำแหน่ง Nonsynonymous จำนวน 1 ตำแหน่ง ยีน *Hd5* พบตำแหน่ง Frameshift deletion จำนวน 1 ตำแหน่ง และตำแหน่ง Nonsynonymous จำนวน 2 ตำแหน่ง ยีน *RFT1* พบตำแหน่ง Nonsynonymous จำนวน 4 ตำแหน่ง และยีน *Hd3a* พบตำแหน่ง Nonsynonymous จำนวน 1 ตำแหน่ง ส่วนยีน *Hd2, Hd4* และ *Ehd1* ไม่พบมีตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ที่ต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กับพันธุ์พ่อ

Table 2 Analyzing the distinct SNPs or InDel positions within the genes *Hd1*, *Hd5*, *RFT1*, and *Hd3a,* which control the early heading date, of both the RD79 rice variety and the RD43 fragrant glutinous rice line

Gene	ID gene	Chr.	Position	Type of mutation	Annotation	Variety of sequence	
						RD79	RD43 line
Hd1	Os06g0275000	6	9,338,006 - 9,338,007	Frameshift deletion	Exon2:c.835_836del:p.F279fs	TT	Deletion
			9,338,224 - 9,338,227	Frameshift deletion	Exon2:c.1053_1056del:p.R351fs	Deletion	AAAG
			9,336,782	Nonsynonymous	Exon1:c.G248A:p.R83H	G	A
Hd5	Os08g0174500	8	4,334,418	Frameshift deletion	Exon1:c.322delA:p.K108fs	T	Deletion
			4,332,771	Nonsynonymous	Exon2:c.C853T:p.R285W	G	A
			4,332,804	Nonsynonymous	Exon2:c.C820G:p.L274V	C	G
RFT1	Os06g0157500	6	2,927,171	Nonsynonymous	Exon1:c.T92C:p.V31A	C	T
			2,928,178	Nonsynonymous	Exon4:c.G313A:p.E105K	A	G
			2,928,296	Nonsynonymous	Exon4:c.G431A:p.S144N	A	G
			2,928,343	Nonsynonymous	Exon4:c.A478G:p.T160A	G	A
Hd3a	Os06g0157700	6	2,942,292 - 2,942,293	Nonsynonymous	Exon4:c.CC535-536AA:p.P179N	AA	CC

Frameshift deletion: InDel mutation changing the open reading frame with deletion, Nonsynonymous: Single nucleotide mutation with changing amino acid sequence, RD43 line: RD43 fragrant glutinous rice line, Chr: Chromosome, c.: Complementary DNA, p.: Protein, English alphabet after protein: Single letter abbreviations of amino acid, Additionally A, T, C, and G base are the DNA base pairs that form the genetic code in organisms.

การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน *Hd1, Hd5, RFT1* และ *Hd3a* ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น โดยยีน *Hd1* ได้เลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ ที่ขนาบข้างหน้าและข้างหลังยีน *Hd1* แบ่งเป็นข้างหน้ายีน จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ RM1925, RM19773, RM19776, RM8226, RM19779 และ RM19780 และข้างหลังยีน จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RM19781, RM8227, RM19782 และ RM19784 ซึ่งได้รวบรวมเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์จากเว็บไซต์ The Rice Annotation Project (RAP) ส่วนยีน *Hd5, RFT1* และ *Hd3a* เลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดลที่ออกแบบใหม่ในงานวิจัยนี้และเป็นส่วนหนึ่งกับยีน โดยยีน *Hd5* เลือกตำแหน่งอินเดล ที่แสดงความต่างกันระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ จำนวน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งเอ็กซอน 1 และตำแหน่งอินทรอน 1 ทำการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งกับยีนในตำแหน่งดังกล่าวจำนวนอย่างละ 2 เครื่องหมายโมเลกุล ยีน *RFT1* เลือกตำแหน่งอินเดล บริเวณ 5′ untranslated region (5′UTR) เป็นตำแหน่งที่ -209 bp ก่อนถึงตำแหน่ง +1 ของยีน RFT1 ทำการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งกับยีน จำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุล และยีน *Hd3a* เลือกตำแหน่งอินเดล บริเวณอินทรอน 3 ทำการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งกับยีนจำนวน 1 เครื่องหมายโมเลกุล **(Table 3)**

Table 3 The design of InDel-type molecular markers is incorporated within the gene regions of *Hd5*, *RFT1*, and *Hd3a*, which regulate the early heading date

Gene	Variety/ Rice line	Location	InDel Sequence	Primer name	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
Hd5	RD79	Exon 1	CCGCCGCCG	Hd5-ex1-PI1	59	146
	RD43 line		Deletion (9 bp)	Hd5-ex1-PI2	57	146
	RD79	Intron 1	G-	Hd5-in1-PI1	57	180
	RD43 line		Insertion (12 bp) G+TTTAAATATATG	Hd5-in1-PI2	53	148
RFT1	RD79	5′UTR (-209 bp)	GCTAGCTTAGTTT GTGTTGCTA	RFT1-5′UTR-PI1	59	244
	RD43 line		Deletion (22 bp)	RFT1-5′-UTR-PI2	57	293
Hd3a	RD79	Intron 3	Insertion (11 bp) T+TATACAAACTT	Hd3a-in3-PI1	59	198
	RD43 line		T-			

RD43 line: RD43 fragrant glutinous rice line

การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น ที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ (จีโนไทป์) และการนำไปใช้ตรวจสอบในประชากร F_2

ผลการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ ที่ยึดติดกับยีน *Hd1* จำนวน 10 เครื่องหมาย ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (อุณหภูมิ annealing ที่ 53 °C) วิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส ในข้าวพันธุ์แม่ (กข79) พันธุ์พ่อ (สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม) และ F_1 พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล RM19776, RM19778, RM19779 และ RM19781 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ และสามารถแยกระหว่างต้นที่มีพันธุกรรมเป็น Homozygous และ Heterozygous ได้ (co-dominance marker) จึงสามารถตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้ (**Figure 2a**) ส่วนผลการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดล ที่เป็นส่วนหนึ่งกับยีน *Hd5* บริเวณตำแหน่งเอ็กซอน 1 จำนวน 2 เครื่องหมาย (Hd5-ex1-PI1 และ Hd5-ex1-PI2) และตำแหน่งอินทรอน 1 จำนวน 2 เครื่องหมาย (Hd5-in1-PI1 และ Hd5-in1-PI2) เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดล ที่เป็นส่วนหนึ่งกับยีน *RFT1* ตำแหน่ง 5′UTR จำนวน 2 เครื่องหมาย (RFT1-5′UTR-PI1 และ RFT1-5′UTR-PI2) และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดล ที่เป็นส่วนหนึ่งกับยีน *Hd3a* ตำแหน่งอินทรอน 3 จำนวน 1 เครื่องหมาย (Hd3a-in3-PI1) พบว่า ทั้ง 7 เครื่องหมายโมเลกุล สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ และเป็นเครื่องหมายแบบ Co-dominant marker (**Figure 2b-c**)

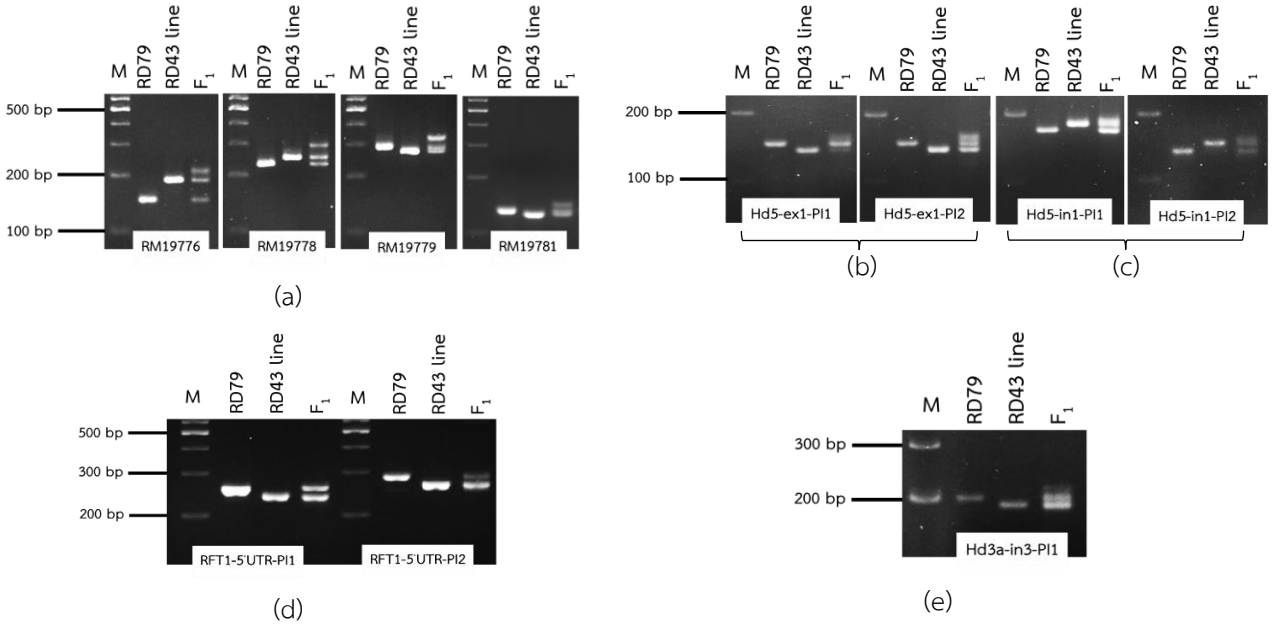


Figure 2 Profiles of molecular markers linked to the *Hd1* gene: (a) RM19776, RM19778, RM19779 and RM19781, and InDel markers located at the gene which regulate the early heading date: (b) Hd5-ex1-PI1 and Hd5-ex1-PI2 markers located within exon 1 of the *Hd5* gene, (c) Hd5-in1-PI1 and Hd5-in1-PI2 markers located within the intron 1 of the *Hd5* gene , (d) RFT1-5′UTR-PI1 and RFT1-5′-UTR-PI2 markers located within the 5′UTR of the *RFT1* gene, and (e) Hd3a-in3-PI1 marker located within the intron 3 of the *Hd3a* gene. These markers were tested in RD79, RD43 fragrant glutinous rice line, and F_1 progenies on a 4% agarose gel. The 100 bp DNA Ladder Plus was used as a reference marker.

หลังจากตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน *Hd1, Hd5, RFT1* และ *Hd3a* ได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนดังกล่าว โดยพิจารณาจากเครื่องหมายที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกันชัดเจนระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กับพันธุ์พ่อ และสามารถแยกระหว่างต้นที่มีพันธุกรรมเป็น Homozygous และ Heterozygous ได้ และนำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไปตรวจสอบกับประชากร F_2 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่จะนำไปตรวจสอบกับประชากร F_2 ดังนี้ เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ ที่ยึดติดกับยีน *Hd1* เลือกใช้เครื่องหมาย RM19779 (อยู่ใกล้ยีน *Hd1* มากที่สุด ห่างจากยีน 20,477 bp) เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดล ที่เป็นส่วนหนึ่งกับยีน *Hd5, RFT1* และ *Hd3a* เลือกใช้เครื่องหมาย Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ตามลำดับ (**Figure 3**)

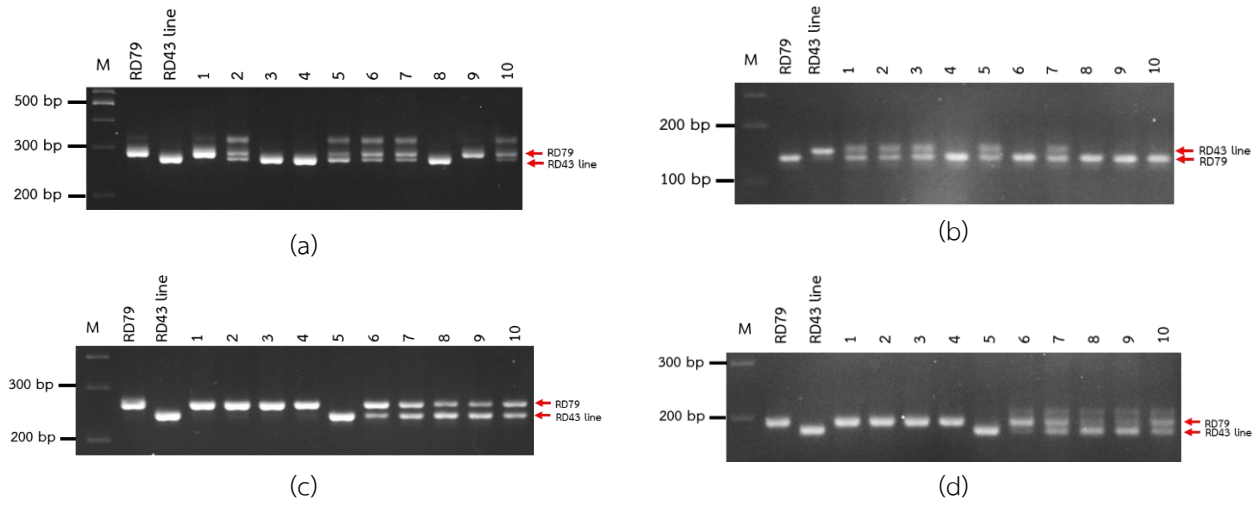


Figure 3 Profiles of molecular markers linked to the Hd1 gene include: (a) RM19779 (an SSR marker), as well as InDel markers located at the gene which regulate the early heading date, such as: (b) the Hd5-in1-PI2 marker located in the *Hd5* gene, (c) the RFT1-5′-UTR-PI1 marker situated in the *RFT1* gene, and (d) the Hd3a-in3-PI1 marker positioned in the *Hd3a* gene. These markers were tested in F_2 progenies using a 4% agarose gel. The RD43 line used was the RD43 fragrant glutinous rice line. Gel lanes 1 to 10 represent different F_2 progenies, while lane M contained the 100 bp DNA Ladder Plus as a reference marker.

ผลการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM19779, Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน *Hd1*, *Hd5, RFT1* และ *Hd3a* ตามลำดับ ไปใช้ตรวจสอบในประชากร F_2 ในสภาพวันยาว และ ในสภาพวันสั้น พบว่า ในสภาพวันยาวเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *RFT1* และ *Hd3a* ตามลำดับ ให้ผลจีโนไทป์และคะแนนจีโนไทป์เหมือนกันทั้งหมด และในสภาพวันสั้นพบต้น F_2 เพียง 1 ต้นที่มีจีโนไทป์และคะแนนจีโนไทป์ของทั้งสองเครื่องหมายแตกต่างกัน นอกจากนี้ ผลการทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 เครื่องหมาย ในประชากร F_2 ทั้งสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 เครื่องหมาย มีการถ่ายทอดของเครื่องหมายโมเลกุลเป็นไปตามสมมติฐาน คือ มีอัตราส่วนจีโนไทป์ในประชากร F_2 เท่ากับ 1RR: 2RD: 1DD ซึ่งเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 กฎการแยกของเมนเดล

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้นกับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM19779, Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน *Hd1*, *Hd5, RFT1* และ *Hd3a* ตามลำดับ ไปใช้ตรวจสอบในประชากร F_2 ในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น นำผลการศึกษาที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล กับอายุวันออกดอกในประชากร F_2

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ (เครื่องหมายโมเลกุล) กับฟีโนไทป์ (อายุวันออกดอกของประชากร F_2) ด้วยวิธี ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ภายหลังการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี LSD พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น แสดงว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอก โดยจีโนไทป์แบบ Homozygous ของสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม ในเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 มีค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอกสั้นที่สุดทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น เท่ากับ 85.72 ± 3.60 และ 84.56 ± 4.56 วัน ตามลำดับ ส่วนจีโนไทป์

ของเครื่องหมาย RM19779 ในสภาพวันยาวค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ในสภาพวันสั้นจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM19779 มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (**Table 4**)

Table 4 ANOVA analysis of relationship between genotype of molecular markers and phenotype (heading date) of F_2 progenies under natural long-day and natural short-day conditions

Molecular marker /Gene	Natural long-day (n = 147)					Natural short-day (n = 138)				
	Genotype	Number	Phenotype (heading date)			Genotype	Number	Phenotype (heading date)		
			Mean	SE	p-value			Mean	SE	p-value
RM19779 */Hd1*	RR	39	104.23^{a}	2.14		RR	32	96.28^{a}	1.23	
	RD	75	101.35^{a}	1.23	0.240^{ns}	RD	77	92.56^{b}	0.74	0.023*
	DD	33	99.79^{a}	1.88		DD	29	94.69^{ab}	1.19	
Hd5-in1-PI2/*Hd5*	RR	40	110.63^{a}	1.56		RR	40	98.75^{a}	0.58	
	RD	78	103.18^{b}	0.86	0.000**	RD	66	95.42^{b}	0.52	0.000**
	DD	29	85.72^{c}	0.67		DD	32	84.56^{c}	0.81	
RFT1-5′UTR-PI1 */RFT1*	RR	38	115.29^{a}	1.68		RR	38	98.45^{a}	1.09	
	RD	84	97.71^{b}	0.84	0.000**	RD	77	92.43^{b}	0.70	0.000**
	DD	25	94.80^{b}	1.23		DD	23	91.13^{b}	1.01	
Hd3a-in3-PI1/*Hd3a*	RR	38	115.29^{a}	1.68		RR	37	98.35^{a}	1.12	
	RD	84	97.71^{b}	0.84	0.000**	RD	78	92.55^{b}	0.70	0.000**
	DD	25	94.80^{b}	1.23		DD	23	91.13^{b}	1.01	

**Significant at $p < 0.01$, *Significant at $p < 0.05$, ^{ns} Non-significant, RR: Homozygous for RD79 alleles, RD: Heterozygous for RD79 and RD43 fragrant glutinous rice line alleles, DD: Homozygous for RD43 fragrant glutinous rice line alleles, n: Number of random samples in the F_2 progenies, SE: Standard error. Means with the same letter are not significantly different from each other ($p < 0.01$ ANOVA followed by LSD test).

การทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาทิศทางและระดับความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RM19779, Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน *Hd1*, *Hd5, RFT1* และ *Hd3a* ตามลำดับ กับอายุวันออกดอกของประชากร F_2 ในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ด้วยวิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ลำดับที่ของสเปียร์แมน พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 มีระดับความสัมพันธ์สูงทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ -0.7101 และ -0.7380 ตามลำดับ (p<0.01) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมาย RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ในสภาพวันยาวมีระดับความสัมพันธ์สูงมีค่า r เท่ากับ -0.6446 เท่ากัน และในสภาพวันสั้นมีระดับความสัมพันธ์ปานกลาง ค่า r เท่ากับ -0.4352 และ -0.4218 ตามลำดับ (p<0.01) ในขณะที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RM19779 มีระดับความสัมพันธ์ต่ำมากทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้นมีค่า r เท่ากับ -0.1461 (p<0.05) และ -0.1287 (p>0.05) ตามลำดับ โดยทุกจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลมีทิศทางและความสัมพันธ์เชิงลบกับอายุวันออกดอกทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น แสดงให้เห็นว่าทุกเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงจีโนไทป์ของข้าวพันธุ์พ่อ (สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม) ในประชากร F_2 สามารถทำให้อายุวันออกดอกสั้นลงได้ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น นอกจากนี้ยังพบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 มีระดับความสัมพันธ์กันสูงมาก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 1 ในสภาพวันยาว และ 0.9906 ในสภาพวันสั้น (**Table 5**)

Table 5 Spearman's correlation analysis between genotype of molecular markers, and genotype of molecular markers and phenotype (heading date) of F_2 progenies in natural long-day and natural short-day

Molecular marker/Gene	Photoperiod	Heading date	Hd3a-in3-PI1 /*Hd3a*	RFT1-5′UTR-PI1 /*RFT1*	Hd5-in1-PI2 /*Hd5*	RM19779 /*Hd1*
RM19779/*Hd1*	NLD (n = 147)	-0.1461*	0.3206**	0.3206**	-0.0162^{ns}	1
	NSD (n = 138)	-0.1287^{ns}	0.3005**	0.2980**	0.1229^{ns}	1
Hd5-in1-PI2/*Hd5*	NLD (n = 147)	-0.7101**	0.1937**	0.1937**	1	
	NSD (n = 138)	-0.7380**	0.0403^{ns}	0.0390^{ns}	1	
RFT1-5′UTR-PI1 /*RFT1*	NLD (n = 147)	-0.6446**	1**	1		
	NSD (n = 138)	-0.4352**	0.9906**	1		
Hd3a-in3-PI1 /*Hd3a*	NLD (n = 147)	-0.6446**	1			
	NSD (n = 138)	-0.4218**	1			
Heading date	NLD (n = 147)	1				
	NSD (n = 138)	1				

**Significant at $p < 0.01$, *Significant at $p < 0.05$, ^{ns} Non- significant, NLD: Natural long-day, NSD: Natural short-day, n: Number of random samples in the F_2 progenies.

การวิเคราะห์การถดถอยระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับอายุวันออกดอกของประชากร F_2 ในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ด้วยวิธีการถดถอยเชิงเดียวเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) ในการอธิบายหรือทำนายอายุวันออกดอก พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *Hd5, RFT1* และ *Hd3a* ตามลำดับ มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น เมื่อพิจารณาจากสมการถดถอยเชิงเดียว คือ $\hat{y} = a + bx$ พบว่าในสภาพวันยาวจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 (x) มีค่า a และ b เท่ากับ 112.88 และ -12.02 วัน ตามลำดับ ได้สมการทำนาย $\hat{y}$ = 112.88 -12.02*(จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2) แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 (x) มีอัลลีลจากพันธุ์พ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 12.02 วัน และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปร (R^2) ของอายุวันออกดอกได้ 50.94% ส่วนในสภาพวันสั้น การมีอัลลีลจากพันธุ์พ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้อายุวันออกดอกสั้นลง 6.89 วัน มีค่า R^2 เท่ากับ 54.81% เช่นเดียวกันกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ ในสภาพวันยาวถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 หรือ Hd3a-in3-PI1 มีอัลลีลจากพันธุ์พ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้อายุวันออกดอกสั้นลง 11.13 วัน เท่ากันและมีค่า R^2 เท่ากับ 39.58% เท่ากัน และในสภาพวันสั้น เมื่อมีอัลลีลจากพันธุ์พ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้อายุวันออกดอกสั้นลง 3.99 วัน ในจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 และสั้นลง 3.91 วัน ในจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd3a-in3-PI1 มีค่า R^2 เท่ากับ 15.25% และ 14.42% ตามลำดับ ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RM19779 ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้น (p>0.05) ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 1.88% และ 0.75% ตามลำดับ (**Table 6**)

Table 6 Simple regression analysis of the relationship between genotype of molecular markers and phenotype (heading date) of F_2 progenies in natural long-day and natural short-day, with the regression model $\hat{y} = a + bx$

Genotype of Molecular marker (x)/Gene	Phenotype (heading date), ($\hat{y}$)									
	Natural long-day (n = 147)					Natural short-day (n = 138)				
	a	b	SE	R^2 (%)	p-value	a	b	SE	R^2 (%)	p-value
RM19779/*Hd1*	103.92	-2.25	1.351	1.878	0.098^{ns}	94.73	-0.88	0.862	0.75	0.311^{ns}
Hd5-in1-PI2/*Hd5*	112.88	-12.02	0.98	50.94	0.000**	100.36	-6.89	0.537	54.81	0.000**
RFT1-5′UTR-PI1 /*RFT1*	111.9	-11.13	1.142	39.58	0.000**	97.43	-3.99	0.807	15.25	0.000**
Hd3a-in3-PI1 /*Hd3a*	111.9	-11.13	1.142	39.58	0.000**	97.38	-3.91	0.816	14.42	0.000**

**Significant at $p < 0.01$, ^{ns} Non-significant, n: Number of random samples in the F_2 progenies, $\hat{y}$: Heading date, a: The constant term, b: Regression coefficient, x: Genotype of molecular marker, SE: Standard error, R^2: Coefficient of determination.

จากผลการวิเคราะห์สมการถดถอยเชิงเดียวพบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 กับอายุวันออกดอกสั้นมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ จึงนำไปวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลมากกว่าหนึ่งเครื่องหมายกับอายุวันออกดอกสั้น แต่จากการทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาทิศทางและระดับความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ด้วยวิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ลำดับที่ของสเปียร์แมน พบว่า มีระดับความสัมพันธ์กันสูงมาก ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น (**Table 5**) เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาความสัมพันธ์เชิงเส้นพหุ (multicollinearity) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อตัวแปรอิสระ (จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล) สองตัวมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กันค่อนข้างสูง (r) จะส่งผลให้ค่าประมาณสัมประสิทธิ์การถดถอยไม่เสถียรหรือมีเครื่องหมายผิดจากที่ควรจะเป็น และค่าคลาดเคลื่อนของสัมประสิทธิ์การถดถอยมีค่ามากกว่าความเป็นจริง จึงใช้การเลือกตัวแปรโดยวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน พบว่า รูปแบบที่ดีที่สุดคือการใช้เครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 ร่วมกับ RFT1-5′UTR-PI1 ที่ยึดติดกับยีน *Hd5* และ *RFT1* ตามลำดับ ซึ่งจีโนไทป์ของทั้งสองเครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ จากสมการถดถอยพหุคูณ คือ $\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2$ สามารถอธิบายได้ดังนี้ ในสภาพวันยาวได้สมการถดถอยที่มีค่า b_0, b_1 และ b_2 เท่ากับ 119.69, -10.42 และ -9.10 วัน ตามลำดับ สมการทำนายอายุวันออกดอก $\hat{y}$ = 119.69 – 10.42*(จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 (x_1)) -9.10*(จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 (x_2)) แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายทั้งสองเครื่องหมายโมเลกุลเหมือนพันธุ์แม่ (RRRR) จะมีอายุวันออกดอก ($\hat{y}$) เท่ากับ 119.69 วัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 (x_2) คงที่ และมีอัลลีลจากพันธุ์พ่อของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 (x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 10.42 วัน ในทำนองเดียวกันเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 (x_1) คงที่ และมีอัลลีลจากพันธุ์พ่อของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 (x_2) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้อายุวันออกดอกสั้นลง 9.10 วัน ซึ่งสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปร (R^2) ของอายุวันออกดอกได้ 76.51% ส่วนในสภาพวันสั้นได้สมการถดถอยที่มีค่า b_0, b_1 และ b_2 เท่ากับ 103.60, -6.78 และ -3.75 วัน ตามลำดับ ได้สมการทำนายอายุวันออกดอก $\hat{y}$ = 103.60 – 6.78*(จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 (x_1)) -3.75*(จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 (x_2)) แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายทั้งสองเครื่องหมายโมเลกุลเหมือนพันธุ์แม่ จะมีอายุวันออกดอก ($\hat{y}$) เท่ากับ 103.60 วัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 (x_2) คงที่ และมีอัลลีลจากพันธุ์พ่อของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 (x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้อายุวันออกดอกสั้นลง 6.78 วัน ในทำนองเดียวกันเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 (x_1) คงที่ และมีอัลลีลจากพันธุ์พ่อของเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 (x_2) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้อายุวันออกดอกสั้นลง 3.75 วัน ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 68.25% (**Table 7**)

Table 7 Multiple regression analysis of the relationship between genotype of molecular markers (Hd5-in1-PI2 and RFT1-5′UTR-PI1) and phenotype (heading date) of F_2 progenies in natural long-day and natural short-day, with the regression model $\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2$

Phenotype (heading date), ($\hat{y}$)							
Natural long-day (n = 147)				Natural short-day (n = 138)			
Regression models $\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2$	SE	R^2 (%)	p-value	Regression models $\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2$	SE	R^2 (%)	p-value
$\hat{y}$ = 119.69 – 10.42x_1 – 9.10x_2	5.61	76.51	0.000**	$\hat{y}$ = 103.60 – 6.78x_1 – 3.75x_2	3.81	68.25	0.000**

**Significant at $p < 0.01$, n: Number of random samples in the F_2 progenies, $\hat{y}$: Heading date, b_0: The constant term, b_1: Regression coefficient, x_1: Genotype of molecular marker Hd5-in1-PI2, x_2: Genotype of molecular marker RFT1-5′UTR-PI1, SE: Standard error, R^2: Coefficient of determination.

วิจารณ์

อายุวันออกดอกของข้าวเป็นลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญสำหรับการปรับตัวให้เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของข้าว อายุวันออกดอกของข้าวถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่และมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้องโดยเฉพาะความยาวของช่วงแสง จากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (อายุวันออกดอก) ของข้าวพันธุ์แม่ (กข79) ข้าวพันธุ์พ่อ (สายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม) ทั้งในสภาพวันยาว และสภาพวันสั้น พบว่า อายุวันออกดอกของข้าวพันธุ์พ่อสั้นกว่าพันธุ์แม่ประมาณ 40 วัน ในสภาพวันยาว และ 25 วัน ในสภาพวันสั้น และจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอก พบว่าสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้นแตกต่างกันเพียง 3.53 วัน ในขณะที่พันธุ์ กข79 มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกในสภาพวันยาวมากกว่าในสภาพวันสั้น ประมาณ 18.93 วัน (**Table 1**) สอดคล้องกับปัญหาที่พบในพันธุ์ กข79 ที่จากการปลูกในหลายพื้นที่พบปัญหามีอายุเก็บเกี่ยวที่ยาวนานเกินไป ประมาณ 135-140 วัน เมื่อปลูกในช่วงเดือนเมษายนและพฤษภาคมซึ่งเป็นสภาพวันยาว แต่เมื่อปลูกในเดือนพฤศจิกายนที่เป็นสภาพวันสั้น อายุเก็บเกี่ยวข้าวจะลดลงอยู่ที่อายุ 110 วัน (ฐานเศรษฐกิจ, 2562)

จากการวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ตำแหน่งเอ็กซอนของยีน *Hd1, Hd2, Hd4, Hd5, RFT1, Hd3a* และ *Ehd1* พบว่า ยีน *Hd1, Hd5, RFT1* และ *Hd3a* มีตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ที่ต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งดังกล่าวมีผลกระทบต่อกรดอะมิโน และอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน (**Table 2**) ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ของยีน *Hd1* ในงานวิจัยนี้พบการเกิด Frameshift deletion ในเอ็กซอนที่ 2 เบส AAAG ขาดหายไปในอัลลีลของข้าวพันธุ์ กข79 และ เบส TT ขาดหายไปในอัลลีลของสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม สอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายของอัลลีลในยีน *Hd1* ของข้าวกว่า 64 พันธุ์ ของ Takahashi et al. (2009) ที่พบอัลลีลของยีน *Hd1* จำนวน 17 ชนิด แบ่งเป็นอัลลีลของยีน *Hd1* ที่ทำงาน (functional *Hd1* allele) จำนวน 8 ชนิด และ อัลลีลของยีน *hd1* ที่ทำงานบกพร่อง (non-functional *Hd1* allele) จำนวน 9 ชนิด ที่ทำให้ข้าวสามารถออกดอกได้ในสภาพวันยาว ซึ่งมีจำนวน 2 ชนิด ที่เป็น Non-functional *Hd1* allele ตรงกับตำแหน่งการเกิด Frameshift deletion ในเอ็กซอนที่ 2 ของข้าวพันธุ์ กข79 และสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม ดังนั้นยีน *Hd1* ของข้าวพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อเป็นอัลลีลที่ทำงานบกพร่องทั้งสองพันธุ์ ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RM19779 ที่ยึดติดกับยีน *Hd1* กับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 ไม่สามารถอธิบายความผันแปร (R^2) ของอายุวันออกดอกสั้นได้ ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น (**Table 6**)

ในการวิเคราะห์ตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ของยีน *Hd5* ในงานวิจัยนี้พบการเกิด Frameshift deletion โดยเบส T ขาดหายไปในเอ็กซอนที่ 1 ซึ่งเป็นอัลลีลของสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม สอดคล้องกับการศึกษาของ Wei et al. (2010) ที่พบในพันธุ์ข้าว IR24 ที่มีอายุวันออกดอกสั้น จากการทำ Map-based cloning ของยีน *Hd5* พบว่ามีการขาดหายไปของจำนวน 1 เบส

ตำแหน่งที่ 322 bp จาก Start codon ทำให้เกิด Frameshift และ Premature termination ส่งผลต่อกรดอะมิโนเหลือเพียง 125 กรดอะมิโน ซึ่งสั้นกว่าปกติมาก ทำให้การทำงานของยีนบกพร่อง และจากการใช้เทคนิค Chromosomal segment substitution lines (CSSL) ย้ายชิ้นส่วนพันธุกรรมยีน *Hd5* ของพันธุ์ข้าว IR24 ที่อายุออกดอกสั้น สู่ฐานพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ Asominori ที่อายุออกดอกช้าในสภาพวันยาว พบว่าสามารถทำให้สายพันธุ์ข้าวดังกล่าวมีอายุวันออกดอกสั้นลงได้ในสภาพวันยาว ซึ่งจากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 ที่เป็นส่วนหนึ่งกับยีน *Hd5* กับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 ในงานวิจัยนี้ พบว่าสามารถอธิบายความผันแปร (R^2) ของอายุวันออกดอกสั้น ได้ทั้งในสภาพวันยาว (50.94%) และสภาพวันสั้น (54.81%) **(Table 6)** แสดงให้เห็นว่าการเกิด Frameshift deletion ในเอ็กซอนที่ 1 มีผลทำให้อายุวันออกดอกสั้นลง

ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ของยีน *RFT1* ในงานวิจัยนี้ การเกิด Nonsynonymous ในเอ็กซอนที่ 4 โดยพบอัลลีลของข้าวพันธุ์ กข79 ที่ออกดอกช้าในสภาพวันยาว เป็นเบส A ส่วนในอัลลีลของสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม ที่มีอายุวันออกดอกสั้น เป็นเบส G สอดคล้องกับการศึกษาของ Ogiso-Tanaka et al. (2013) พบอัลลีลของยีน *RFT1* ที่ทำงานบกพร่อง ในข้าว *indica* พันธุ์ Nona Bokra ที่ออกดอกช้าในสภาพวันยาว เกิดจากการแทนที่คู่เบสจากเบส G ไปเป็นเบส A ในเอ็กซอนที่ 4 ส่งผลให้กรดอะมิโนลำดับที่ 105 เปลี่ยนจากกรดกลูตามิกไปเป็นไลซีน มีผลต่อยีน *RFT1* ให้การทำงานบกพร่อง ทำให้ข้าว Nona Bokra ออกดอกช้าในสภาพวันยาว ซึ่งตรงกับอัลลีลของข้าวพันธุ์ กข79 ที่เป็นเบส A ในตำแหน่งนี้ และออกดอกช้าในสภาพวันยาว ส่วนในยีน *Hd3a* ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ของงานวิจัยนี้ ในตำแหน่ง cDNA ที่ 535-536 bp อัลลีลของข้าวพันธุ์ กข79 มีลำดับเบสในตำแหน่งดังกล่าวเป็นเบส AA ส่วนในอัลลีลของสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอมเป็นเบส CC **(Table 2)** สอดคล้องกับการศึกษาของ Kojima et al. (2002) ที่พบว่า การแทนที่คู่เบสจากเบส CC ไปเป็นเบส AA ที่พบในข้าวพันธุ์ Kasalath ทำให้อายุวันออกดอกสั้นในสภาพวันสั้นแต่จะออกดอกช้าในสภาพวันยาว

นอกจากนี้ยังพบว่า เครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *RFT1* และ *Hd3a* ตามลำดับ มีระดับความสัมพันธ์กันสูงมากระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลด้วยกัน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 1 และ 0.99 ในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ตามลำดับ **(Table 4)** ทั้งนี้อาจเนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้กัน (*RFT1* และ *Hd3a*) โดยยีน *RFT1* ที่อยู่ห่างจากยีน *Hd3a* ที่ 11.5 kb บนโครโมโซม 6 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันมากถึง 91% และทำหน้าที่ในการชักนำการออกดอกของข้าวเช่นเดียวกัน (Kojima et al., 2002) และจากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล กับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 พบว่า ในสภาพวันยาวเครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 สามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอกสั้นได้ 39.58% เท่ากัน และในสภาพวันสั้น สามารถอธิบายความผันแปร (R^2) ของอายุวันออกดอกสั้นได้ใกล้เคียงกันมาก เท่ากับ 15.25% และ 14.42% ตามลำดับ **(Table 6)** โดยในสภาพวันสั้นพบต้น F_2 เพียง 1 ต้น ที่จีโนไทป์ของทั้งสองเครื่องหมายต่างกัน แสดงให้เห็นว่ายีนทั้งสองอยู่ใกล้กันมากเมื่อมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์โอกาสการเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมคู่เหมือน (crossing over) ระหว่างสองยีนนี้เกิดขึ้นได้น้อยมาก และจากผลการทดลองดังกล่าวยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่า ยีน *RFT1* หรือ *Hd3a* มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นมากกว่ากัน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

สรุป

จากการใช้เทคโนโลยีอ่านลำดับดีเอ็นเอทั้งจีโนม (WGS) ช่วยวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ (SNPs) และ อินเดล (InDel) ที่มีผลให้กรดอะมิโนในข้าวพันธุ์แม่ กข79 และพันธุ์พ่อสายพันธ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม ต่างกันภายในยีนที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น จำนวน 7 ยีน ได้แก่ *Hd1, Hd2, Hd4, Hd5, RFT1, Hd3a และ Ehd1* พบว่ายีน *Hd1, Hd5, RFT1* และ *Hd3a* มีตำแหน่งสนิปส์ และอินเดล ที่แตกต่างกันในข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ จึงค้นหาเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ที่ยึดติดกับยีน *Hd1* และออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดล ที่เป็นส่วนหนึ่งกับยีน *Hd5, RFT1* และ *Hd3a* จนได้เครื่องหมายโมเลกุล RM19779 ที่ยึดติดกับยีน *Hd1* และเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *Hd5, RFT1* และ *Hd3a* ตามลำดับ

นำไปใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ ในสภาพวันยาว จำนวน 147 ต้น และ ในสภาพวันสั้น จำนวน 138 ต้น จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับอายุวันออกดอก ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเดียว พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2, RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *Hd5* มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นมากที่สุด โดยสามารถอธิบายความผันแปร (R^2) ของอายุวันออกดอกสั้นได้ 50.94% ในสภาพวันยาว และ 54.81% ในสภาพวันสั้น ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล RM19779 ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น นอกจากนี้การวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลมากกว่าหนึ่งเครื่องหมายกับอายุวันออกดอก โดยใช้การเลือกตัวแปรโดยวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน พบว่า รูปแบบที่ดีที่สุดคือ การใช้เครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 ร่วมกับ RFT1-5′UTR-PI1 ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *Hd5* และ *RFT1* ตามลำดับ ซึ่งจีโนไทป์ของทั้งสองเครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้น โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 76.51% ในสภาพวันยาว และ 68.25% ในสภาพวันสั้น

ดังนั้น เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล Hd5-in1-PI2 และ RFT1-5′UTR-PI1 ทั้ง 2 ตำแหน่งนี้ร่วมกันจะช่วยให้การคัดเลือกข้าวที่มีอายุวันออกดอกสั้น ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ เครื่องหมายโมเลกุล RFT1-5′UTR-PI1 และ Hd3a-in3-PI1 ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *RFT1* และ *Hd3a* ตามลำดับ มีระดับความสัมพันธ์กันสูงมากระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลด้วยกัน ทั้งในสภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้กัน (ห่างกันเพียง 11.5 kb) ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นมากกว่ากัน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมการข้าว อนุเคราะห์พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา และ หน่วยความเป็นเลิศด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าว มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อำนวยสถานที่แปลงนาทดลอง ห้องแลปวิจัย เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2563. องค์ความรู้เรื่องข้าว. แหล่งข้อมูล http://www.ricethailand.go.th/rkb3/Disease.htm. ค้นเมื่อ 31 ตุลาคม 2563.

การเงินธนาคาร. 2563. ส่งออกข้าวไทยปี 63 ทรุดต่อเนื่อง มุ่งพัฒนาข้าวขาวพื้นนิ่ม เพื่อเป็น Fighting Product. แหล่งข้อมูล: https://www.moneyandbanking.co.th/article/news/kreserch-thairice-01042020/. ค้นเมื่อ 30 สิงหาคม 2564.

ชัยวัฒน์ สร้อยเจริญสุข. 2566. แนวโน้มธุรกิจ/อุตสาหกรรม 2566-2568: อุตสาหกรรมข้าว. แหล่งข้อมูล https://www.krungsri.com/th/research/industry/industry-outlook/agriculture/rice/io/io-rice-2023-2025. ค้นเมื่อ 9 ธันวาคม 2566.

ฐานเศรษฐกิจ. 2562. ส่องอนาคต “กข79” รุ่งหรือร่วง. แหล่งข้อมูล https://www.thansettakij.com/content/Macro_econ/412010. ค้นเมื่อ 30 สิงหาคม 2564.

ฐานเศรษฐกิจ. 2563. เดินตามแผน “บิ๊กตู่” ปั้นข้าวกข79 ป้อนตลาดโลก. แหล่งข้อมูล https://www.thansettakij.com/business/438286. ค้นเมื่อ 30 สิงหาคม 2564.

ประชาชาติธุรกิจ. 2564. เศรษฐกิจในประเทศ เฟ้นหา “พันธุ์ข้าวใหม่” กู้ส่งออก 4 เดือนไทยตกอันดับ. แหล่งข้อมูล: https://www.prachachat.net/economy/news-678734. ค้นเมื่อ 1 กรกฎาคม 2564.

สมถวิล วิจิตรวรรณา. 2565. สถิติความสัมพันธ์: เลือกใช้อย่างไร. วารสารมนุษยศาสตร์และ สังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชพฤกษ์. 8(2): 1-15.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2564. "จีโนมข้าว" ตัวเร่งการพัฒนาพันธุ์ข้าวไทย. แหล่งข้อมูล https://www.nstda.or.th/home/performance_post/rice-genome/. ค้นเมื่อ 26 กันยายน 2564.

Doi, K., T. Izawa, T. Fuse, U. Yamanouchi, T. Kubo, Z. Shimatani, M. Yano, and A. Yoshimura. 2004. *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of *Hd1*. Journal of Genes and Development. 18: 926-936.

Fujino, K., U. Yamanouchi, and M. Yano. 2013. Roles of the Hd5 gene controlling heading date for adaptation to the north ern limits of rice cultivation. Journal of Theoretical and Applied Genetics. 126: 611-618.

Hayama, R., S. Yokoi, S. Tamaki, M. Yano, and K. Shimamoto. 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. Journal of Nature. 422: 719-722.

Kim, S. L., S. Lee, H. J. Kim, H. G. Nam, and G. An. 2007. *OsMADS51* is a short-day flowering promoter that functions upstream of *Ehd1, OsMADS14*, and *Hd3a*. Journal of Plant Physiology. 145: 1484-1494.

Kojima, S., Y. Takahashi, Y. Kobayashi, L. Monna, T. Sasaki, T. Araki, and M. Yano. 2002. *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. Journal of Plant Cell Physiology. 43: 1096-1105.

Komiya, R., A. Ikegami, S. Tamaki, S. Yokoi, and K. Shimamoto. 2008. *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. Journal of Development. 135: 767-774.

Komiya, R., S. Yokoi and K. Shimamoto. 2009. A gene network for long-day flowering activates *RFT1* encoding a mobile flowering signal in rice. Journal of Development. 136: 3443-3450.

Laloum, T., S.D. Mita, P. Gamas, M. Baudin, and A. Niebel. 2013. CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many ?. Journal of Trends in Plant Science. 18: 157-166.

Lee, Y. S., and G. An. 2015. Complex regulatory networks of flowering time in rice. Journal of Rice Research: Open Access. 3: 141.

Lin, H. X., T. Yamamoto, T. Sasaki, and M. Yano. 2000. Characterization and detection of epistatic interactions of three QTLs, *Hd1*, *Hd2* and *Hd3*, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. Journal of Theoretical and Applied Genetics. 101: 1021-1028.

Nonoue, Y., K. Fujino, Y. Hirayama, U. Yamanouchi, S. Lin, and M. Yano. 2008. Detection of quantitative trait loci con trolling extremely early heading in rice. Journal of Theoretical and Applied Genetics. 116: 715-722.

Ogiso-Tanaka, E., K. Matsubara, S. Yamamoto, Y. Nonoue, J. Wu, H. Fujisawa, H. Ishikubo, T. Tanaka, T. Ando, T. Matsumoto, and M. Yano. 2013. Natural variation of the *RICE FLOWERING LOCUS T 1* contributes to flowering time divergence in rice. Journal of PLoS One. 8(10): e75959.

Ryu, C. H., S. Lee, S. L. Kim, Y. S. Lee, S. C. Choi, H. J. Jeong, J. Yi, S. J. Park, C. D. Han, and G. An. 2009. *OsMADS50* and *OsMADS56* function antagonistically in regulating long day (LD)-dependent flowering in rice. Journal of Plant, Cell and Environment. 32: 1412-1427.

Takahashi, Y., K. M. Teshima, S. Yokoi, H. Innan, and K. Shimamoto. 2009. Variations in *Hd1* proteins, *Hd3a* promoters, and *Ehd1* expression levels contribute to diversity of flowering time in cultivated rice. Journal of Proceedings of the National Academy of Sciences. 106: 4555–4560.

Tsuji, H., S. Tamaki, R. Komiya, and K. Shimamoto. 2008. Florigen and the photoperiodic control of flowering in rice. Journal of Rice. 1: 25-35.

Vergara, B. S., and T.-T. Chang. 1985. The flowering response of the rice plant to photoperiod: a review of the literature. 4th Edition. IRRI, Los Baños.

Wei, X., J. Xu, H. Guo, L. Jiang, S. Chen, C. Yu, Z. Zhou, P. Hu, H. Zhai, and J. Wan. 2010. *DTH8* suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously. Journal of Plant Physiology. 153: 1747-1758.

Xue, W., Y. Xing, X. Weng, Y. Zhao, W. Tang, L. Wang, H. Zhou, S. Yu, C. Xu, X. Li, and Q. Zhang. 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. Journal of Nature Genetics. 40: 761-767.

Yano, M., Y. Katayose, M. Ashikari, U. Yamanouchi, L. Monna, T. Fuse, T. Baba, K. Yamamoto, Y. Umehara, Y. Nagamura, and T. Sasaki. 2000. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the arabidopsis flowering time gene CONSTANS. Journal of The Plant Cell. 12: 2473-2483.