Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

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

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับขนาดเมล็ด ในประชากรเมล็ด F_5 ของคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย (KDML 105-9351(57D)) กับ Basmati

Development of DNA markers related to grain size in F_5 seed population of a cross between KDML 105 photoperiod-insensitive, semi-dwarf rice line (KDML 105-9351(57D)) and Basmati rice

พินิดา ภูผา[1]*, แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1], ยุพเยาว์ คบพิมาย[1], กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง[2] และ วราภรณ์ แสงทอง[1]*

Pinida Poopa[1]*, Saengtong Pongjaroenkit[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: ขนาดเมล็ดข้าวเป็นลักษณะสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพข้าว ซึ่งพิจารณาจากความยาว ความกว้าง และความหนา ขนาดเมล็ดถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับขนาดเมล็ดในประชากรเมล็ด F_5 ของคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย (KDML 105-9351(57D)) กับ Basmati ในงานวิจัยนี้ได้อ่านลำดับเบสทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่ KDML 105-9351(57D) และพันธุ์พ่อ Basmati และนำลำดับเบสของพันธุ์พ่อแม่ที่ได้มาเปรียบเทียบหาความแตกต่างของยีนในวิถีการควบคุมขนาดของเมล็ดข้าวจำนวน 83 ตำแหน่ง ได้ค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 29 ตำแหน่งที่สามารถแยกระหว่าง homozygous ของอัลลีลพันธุ์แม่หรืออัลลีลพันธุ์พ่อ และ heterozygous ระหว่างอัลลีลพันธุ์แม่และอัลลีลพันธุ์พ่อได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ด้วยวิธี Simple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 SMG1 TGW6 GS5* และ *GW6a* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ มีค่า R^2 เท่ากับ 55.51 54.50 52.61 13.59 4.37 3.79 และ 2.93% ตามลำดับ ขณะที่พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *qGL7-2 GL7 GS7 GW10* และ *TGW6* กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ มีค่า R^2 เท่ากับ 50.62 50.54 46.31 4.16 และ 3.26% ตามลำดับ และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 8 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 TGW6 GW6a GW10 GL4* และ *qGL10* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ มีค่า R^2 เท่ากับ 17.13 16.27 14.52 13.17 7.44 6.06 3.73 และ 2.92% ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Multiple regression พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7 SMG1* และ *TGW6* ร่วมกัน มีความสัมพันธ์กับความยาวเมล็ด มีค่า R^2 เท่ากับ 64.15% ขณะที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2 GW10* และ *TGW6* ร่วมกัน มีความสัมพันธ์กับความกว้างเมล็ด (R^2 เท่ากับ 55.39%) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7, TGW6, qGL10* และ *GW10* ร่วมกัน มีความสัมพันธ์กับความหนาเมล็ด (R^2 เท่ากับ 36.60%) เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่สัมพันธ์กับขนาดเมล็ดที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง KDML 105-9351(57D) และ Basmati ให้มีขนาดเมล็ดยาว กว้าง และหนาขึ้นได้ โดยเป็นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม

* Corresponding author: pinidapoopa@gmail.com, varapornsangtong@yahoo.com

Received: date; September 4, 2023 Revised: date; January 20, 2024

Accepted: date; January 31, 2024 Published: date;

คำสำคัญ: เครื่องหมายดีเอ็นเอ; ขนาดเมล็ดข้าว; ความยาวเมล็ด; ความกว้างเมล็ด; ความหนาเมล็ด

ABSTRACT: The size of rice grains is a critical trait that impacts both yield and quality. Considered by length, width, and thickness, it is controlled by polygene. This research aimed to develop grain size-related DNA markers in the F_5 seed population of a cross between KDML 105 photoperiod-insensitive, semi-dwarf rice line (KDML 105-9351(57D)) and Basmati rice. In this research, the whole genome sequence of the female parent, KDML 105-9351(57D), and the male parent, Basmati variety, were examined. A comparative analysis of the DNA sequences of the parents was conducted to identify the differences in genes that involved in controlling the size of rice grains at 83 loci. A set of 29 gene markers was discovered and developed, allowing for the discrimination between homozygous alleles of the female parent or male parent and heterozygous alleles between the female and male parent alleles. The analysis of the correlation between genotype and phenotype by Simple regression method was performed. The genotypes of 7 DNA markers of *GL7, qGL7-2, GS7, SMG1, TGW6, GS5* and *GW6a* genes, were found to be significantly relationship with grain length, with the R^2 values of 55.51, 54.50, 52.61, 13.59, 4.37, 3.79 and 2.93% respectively. The genotypes of 5 DNA markers of *qGL7-2, GL7, GS7, GW10* and *TGW6* genes, were significantly relationship with grain width, with the R^2 values of 50.62, 50.54, 46.31, 4.16 and 3.26%, respectively. The genotypes of 8 DNA markers of *GL7, qGL7-2, GS7, TGW6, GW6a, GW10, GL4* and *qGL10* genes, were significantly relationship with grain thickness, with the R^2 values of 17.13, 16.27, 14.52, 13.17, 7.44, 6.06, 3.73 and 2.92%, respectively. Analyzed by Multiple regression method, genotypes of DNA markers of *GL7, SMG1* and *TGW6* genes model were related with grain length, with the R^2 value of 64.15%. While the genotypes of DNA markers of *qGL7-2, GW10* and *TGW6* genes model were related to grain width (R^2 55.39%). The genotype of DNA markers of *GL7, TGW6, qGL10* and *GW10* genes model were related to grain thickness (R^2 36.60%). The DNA markers of these grain size-related genes will be used to improve the progeny generated from KDML 105-9351(57D) and Basmati for longer, wider, and thicker grains. It is the use of DNA marker-assisted selection and conventional breeding.
Keywords: DNA markers; rice grain size; grain length; grain width; grain thickness

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นหนึ่งในธัญพืชอาหารที่สำคัญ การเพิ่มขึ้นของประชากรโลกทำให้เกิดการขาดแคลนด้านอาหาร ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อรับประกันความมั่นคงทางอาหารในอนาคต (Hori and Sun, 2022) จากข้อมูลผลผลิตข้าวของไทยระหว่าง ปี 2563-2565 พบผลผลิตข้าวหอมมะลิ เฉลี่ย 362 ถึง 428 กก./ไร่ ข้าวหอมปทุมธานี 1 เฉลี่ย 675 กก./ไร่ ข้าวเจ้าอื่น ๆ เฉลี่ย 601 กก./ไร่ และข้าวเหนียว เฉลี่ย 390 กก./ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2566) การเพิ่มผลผลิตข้าวมีองค์ประกอบหลายลักษณะเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น จำนวนรวงต่อกอ (number of panicles per plant) จำนวนเมล็ดต่อรวง (number of seeds per panicle) น้ำหนัก 1,000 เมล็ด (1,000 grain weight) และขนาดของเมล็ด (seed size) (Rasheed et al., 2022; Shin et al., 2022) ซึ่งขนาดเมล็ดจะพิจารณาจากความยาวเมล็ด (grain length; GL) ความกว้างเมล็ด (grain width; GW) และความหนาเมล็ด (grain thickness; GT) หากต้องการเพิ่มปริมาณของผลผลิตการเพิ่มขนาดของเมล็ดจึงมีส่วนสัมพันธ์โดยตรงต่อน้ำหนักเมล็ด

นอกจากผลผลิตแล้ว คุณภาพของเมล็ดยังได้รับความสนใจเป็นพิเศษจากผู้บริโภค อุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกร และผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ (Fitzgerald et al., 2009) การพิจารณาด้านรูปร่างเมล็ดเป็นสิ่งสำคัญในการกำหนดราคาข้าว นอกจากนี้ความนิยมในการบริโภคข้าวของแต่ละพื้นที่ก็แตกต่างกัน เช่น ประเทศแถบเอเชียส่วนใหญ่ ยุโรป และสหรัฐอเมริกา นิยมบริโภคข้าวที่มีรูปร่างเรียวยาว แต่ในประเทศญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และศรีลังกา นิยมบริโภคข้าวเมล็ดสั้นและกลม (Calingacion et al., 2014; Custodio et al., 2016) พันธุ์ข้าวเมล็ดยาวที่รู้จักกันดีในตลาดโลก ได้แก่ ข้าวบาสมาติของอินเดีย และข้าวหอมมะลิของไทย ซึ่งทั้ง 2 พันธุ์นี้เมื่อหุงสุกจะ มีกลิ่นหอมพิเศษ รสหวาน เนื้อสัมผัสนุ่ม หุงขึ้นหม้อ แต่ที่เหนือกว่าลักษณะดังกล่าวพบว่าข้าวบาสมาติบางสายพันธุ์เมื่อหุงสุกจะมีอัตราการยืดตัวตามความยาวได้มาก เช่น พันธุ์ Pusa Basmati 1121 มีอัตราการยืดตัวตามความยาวได้มากกว่า 2.7 เท่า (Singh et al., 2018) จากคุณลักษณะพิเศษนี้ทำให้ข้าวบาสมาติมีราคาที่สูงกว่าข้าวหอมมะลิของไทย

ขนาดของเมล็ดเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci; QTLs) (Cheng et al., 2021) ถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง (polygene) (Ali et al., 2014) และถูกควบคุมด้วยหลายกลไกที่มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกัน ประกอบด้วย G protein signaling, ubiquitin–proteasome pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, phytohormone signaling และ transcription factors (TFs) (Zhao et al., 2022; Chen et al., 2021) ปัจจุบันมีการระบุ QTLs ที่เกี่ยวข้องกับขนาดเมล็ดมากกว่า 400 QTLs และกระจายทั่วทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว (Zuo and Li 2014; Kashif et al., 2020) ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมามีการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมขนาดเมล็ดข้าว เช่น *GW2* (Song et al. 2007) *GS2/GL2* (Che et al. 2016; Hu et al. 2015) *GS3* (Fan et al. 2006) *qLGY3/OsLG3b* (Liu et al., 2018; Yu et al., 2018) *TGW3/qTGW3/GL3.3* (Hu et al., 2018; Xia et al. 2018; Ying et al. 2018) *GL3.1/qGL3* (Qi et al. 2012; Zhang et al. 2012) *GS5* (Li et al. 2011) *GW5/qSW5* (Duan et al., 2017; Weng et al., 2008) *TGW6* (Ishimaru et al., 2013) *GW6a* (Song et al., 2015) *GL7/GW7* (Wang et al., 2015a; Wang et al., 2015b) และ *GW8* (Wang et al., 2012) โดยยีน *gw2, GS5* และ *gw5* มีส่วนทำให้ความกว้างและน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น (Li et al., 2011; Song et al. 2007; Weng et al. 2008) ในขณะที่ยีน *qlgy3 gs3 gl3.1* และ *tgw3* มีส่วนทำให้ความยาวและน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น (Fan et al., 2006; Hu et al., 2018; Liu et al., 2018; Qi et al., 2012) ยีน *GS2* ทำให้ความยาว ความกว้าง และน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น แต่ส่งผลให้เมล็ดมีลักษณะท้องไข่ด้วยเช่นกัน ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ดีด้านคุณภาพข้าว (Hu et al., 2015) ยีน *GL7* มีส่วนทำให้ความยาวเมล็ดเพิ่มขึ้น แต่ความกว้างเมล็ดลดลงโดยไม่ส่งผลต่อน้ำหนักเมล็ด และถูกกำหนดให้เป็นยีนคุณภาพเมล็ดสำหรับลดลักษณะท้องไข่ของเมล็ดข้าว (Wang et al., 2015b) ยีน *GW8* มีส่วนทำให้ความกว้างและน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น และอัลลีล *gw8* ที่สูญเสียการทำงานทำให้ความยาวเมล็ดเพิ่มขึ้นแต่ก็มีผลทำให้น้ำเมล็ดลดลงด้วย (Wang et al., 2012) ยีน *GLW7* มีบทบาทในการกำหนดความยาวและน้ำหนักเมล็ด (Si et al., 2016) ยีน *GS6* มีส่วนในการเพิ่มความกว้างและน้ำหนักเมล็ด (Sun et al., 2013) และการวิเคราะห์เชิงหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวของกับการควบคุมขนาดเมล็ดระบุว่า ยีน *GS2, GS5, GW6a, GLW7, GL7* และ *GW8* เป็นยีนควบคุมเชิงบวก ในขณะที่ยีน *GW2 qLGY3 GS3 GL3.1 TGW3 GW5 GS6* และ *TGW6* เป็นยีนควบคุมเชิงลบ (Li et al., 2018; Zhang et al., 2020)

ยีน *GS3* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 3 เป็นยีนหลัก (major gene) ในการควบคุมความยาวและน้ำหนักเมล็ด และเป็นยีนรอง (minor gene) ในการควบคุมความกว้างและความหนาของเมล็ด (Fan et al., 2006) การแทนที่เบส C เป็นเบส A ใน exon 2 ทำให้เกิดรหัสหยุดก่อนตำแหน่งหยุด (premature stop codon) ส่งผลให้ความยาวเมล็ดเพิ่มขึ้น (Ngangkham et al., 2018) ยีน *GL7/GW7* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 เป็น QTL หลักในการควบคุมความยาวและความกว้างของเมล็ด มีบทบาทเชิงบวกกับความยาวเมล็ดโดยทำหน้าที่ส่งเสริมการยืดตัวตามยาวมีผลทำให้เมล็ดยาวขึ้น (Zhong et al., 2023) แต่มีบทบาทเชิงลบกับความกว้างเมล็ดโดยลดการแบ่งเซลล์ในทิศทางตามขวาง (Li et al., 2022) ยีน *GL7* มีปฏิสัมพันธ์กับ SBP domain-containing transcription factor ของ *GW8* ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวกในการควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแสดงออกที่สูงขึ้นของยีน *GW8* ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการสะสมน้ำหนักเมล็ดทำให้เมล็ดมีความกว้างและผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้น (Wang et al., 2015a; Wang et al., 2015b) ยีน *qGL7* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 มีขนาดเท่ากับ 258 kb เป็น QTL รองทำหน้าที่ควบคุมลักษณะความยาว ความกว้าง ความหนาของเมล็ด น้ำหนัก 1,000 เมล็ด และจำนวนดอกต่อช่อ (Bai et al., 2010) เช่นเดียวกับยีน *qGL7-2* ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับความยาวเมล็ดในประชากร F_2 และ $F_{2:3}$ ของคู่ผสมระหว่างข้าวเมล็ดยาวพันธุ์ D50 (*Javanica*) และข้าวเมล็ดสั้นพันธุ์ HB277 (*Indica*) (Shao et al., 2010) ยีน *GS5* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 5 กำหนดรหัสของ serine carboxypeptidase ควบคุมความกว้างเมล็ด การสะสมน้ำหนักเมล็ด และอัตราการติดเมล็ด (Dong et al., 2022; Xu et al., 2015) ความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์มีผลต่อขนาดเมล็ดเนื่องจากกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงไป (Zuo and Li, 2014) ยีน *TGW6* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 เป็น QTL หลักที่ควบคุมน้ำหนักเมล็ด กำหนดรหัสของ indole-3-acetic acid (IAA)-glucose hydrolase เพื่อสร้าง IAA อิสระ โดยอัลลีล *tgw6* ที่สูญเสียการทำงานจะส่งเสริมความยาวและน้ำหนักเมล็ด (Ishimaru et al., 2013) ยีน *GW6a* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 ซึ่งกำหนดรหัสของโปรตีน GCN5-related N-acetyl-transferase-like (GNAT-like) เป็น histone acetyltransferase ซึ่งหากแสดงออกมากเกินไปจะทำให้เพิ่มความยาวเมล็ดโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Gao et al., 2021; Song et al., 2015) ยีน *SMG1* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 มีบทบาทเชิงบวกในการควบคุมขนาดเมล็ด (Li et al., 2018) กำหนดรหัสของโปรตีน Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) ในการควบคุมขนาดเมล็ด ซึ่งส่งผลต่อการตอบสนองของ brassinosteroid (BR) รวมถึงการแสดงออกของยีนในวิถีที่เกี่ยวข้องกับ BR ที่กระตุ้นการทำงานของไมโทเจนในข้าว (mitogen-activated protein kinase; MAPK) การกลายพันธุ์ของยีน *smg1* ทำให้ข้าวมี

ขนาดเล็ก ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ BR หลายตัว (Duan et al., 2014) ยีน *GL4* ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 4 เป็น QTL สำหรับความยาวเมล็ด กำหนดรหัสของ Myb-like protein ที่คล้ายกับ *SH4/SHA1* ทำหน้าที่ควบคุมการยืดตัวของเซลล์ตามยาวของกลีบรองดอกทั้งด้านนอกและด้านในที่มีผลต่อความยาวเมล็ด การเกิด single nucleotide polymorphism (SNP) ทำให้เกิดรหัสหยุดก่อนตำแหน่งหยุดส่งผลให้ข้าวมีขนาดเล็ก (Wu et al., 2017) ยีน *GW10* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 10 กำหนดรหัสของ P450 subfamily 89A2 homology protein มีบทบาทเชิงบวกในการควบคุมขนาดและจำนวนเมล็ดผ่านวิถี BR การแสดงออกที่ต่ำของ *GW10* มีส่วนทำให้เมล็ดข้าวสั้นและแคบลง แต่มีจำนวนเมล็ดที่เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกที่มากเกินไปของ *GW10* มีส่วนทำให้เมล็ดข้าวยาวและกว้างขึ้น (Zhan et al., 2021) ยีน *qGL10/OsMADS56* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 10 ซึ่งกำหนดรหัสของโปรตีน MIKC-type MADS-box ควบคุมเฉพาะความยาวเมล็ดโดยไม่กระทบต่อความกว้างเมล็ด โดย *qGL10* ส่งผลต่อการพัฒนาเซลล์ของเปลือกเมล็ดตามยาวโดยไม่ส่งผลต่อการพัฒนาเซลล์ตามขวาง ซึ่งส่งผลให้น้ำหนัก 1,000 เมล็ดเพิ่มขึ้น จากการเปลี่ยนแปลงบริเวณโปรโมเตอร์หรือประมาณ 2 kb จาก start codon ทำให้มีการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ความยาวเมล็ดเพิ่ม (Chen et al., 2023)

ปัจจุบันเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (next-generation sequencing; NGS) เริ่มเข้ามามีความสำคัญในด้านการปรับปรุงพันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลมากขึ้น โดยเข้ามาช่วยวิเคราะห์ลำดับเบสของจีโนมข้าวได้ยาวมากขึ้น ครอบคลุมตำแหน่งยีนที่สนใจ และสามารถค้นพบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสได้ ทำให้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย ซึ่งมีความแม่นยำกว่าเมื่อเทียบกับเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน (Yang et al., 2019) การใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS) ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่าย ย่นระยะเวลา และเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมาก เนื่องจากเป็นการคัดเลือกที่ยีนซึ่งไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม (Xie et al., 2006; Bazrkar-Khatibani et al., 2019) ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับขนาดเมล็ด ในประชากรเมล็ด F_5 ของคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย (KDML 105-9351(57D)) กับ Basmati โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จะถูกใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง KDML 105-9351(57D) และ Basmati เพื่อคัดเลือกให้ข้าวมีขนาดเมล็ดยาว กว้าง และหนาขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำขึ้น นอกจากนี้ขั้นตอนและวิธีการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่สัมพันธ์กับขนาดเมล็ดที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานที่ดีสำหรับใช้ในปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์อื่นๆ และพืชอื่นๆ ให้มีขนาดเมล็ดหรือลักษณะอื่นๆ ตามต้องการได้

วิธีการศึกษา

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย-BC_8F_4-9351(57D) ให้ชื่อย่อ KDML 105-9351(57D) เป็นสายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นโดยหน่วยความเป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และเป็นส่วนหนึ่งของโครงการการทดสอบผลผลิตภายในสถานีของสายพันธุ์ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย ข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข15 และขาวดอกมะลิ 105 ได้รับทุนวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.) สายพันธุ์ KDML 105-9351(57D) ปรับปรุงพันธุ์มาจากพันธุ์รับ คือ พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ให้ คือ สายพันธุ์ กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย โดยการปรับปรุงพันธุ์ใช้วิธีผสมกลับไปหาขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 8 ครั้ง ได้เป็น BC_8F_1 จากนั้นปลูกต้น BC_8F_1 และปล่อยผสมตัวเองอีก 4 ชั่ว จึงได้เป็น BC_8F_4 และการปรับปรุงพันธุ์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Heading date 1* (*Hd1*) (*Os06g0275000*) *Semidwarf* (*sd-1*) (*Os01g0883800*) และ *Waxy* (*wx*) (*Os06g0133000*) ในการคัดเลือก รวมทั้งใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด flanking markers และ background markers ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง เพื่อคัดเลือกต้นที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มากที่สุด ทำให้สายพันธุ์นี้มีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ถึง 99.81%

ข้าวพันธุ์ Basmati จัดอยู่ในกลุ่มข้าวมีกลิ่นหอม (aromatic rice) (Civan et al., 2019) ข้าวบาสมาติดั้งเดิมเป็นผลิตภัณฑ์ประจำชาติของอินเดีย (Agriculture, 2022) เมล็ดมีรูปร่างเรียวยาวมาก (extra-long slender grain) เมล็ดข้าวสุกยืดตัวตามความยาว

ได้ยาวมาก (Singh et al., 2018) มีกลิ่นหอมพิเศษ รสหวาน เนื้อสัมผัสของข้าวสุกนุ่ม หุงขึ้นหม้อ และไม่ติดกัน (Bhattacharjee et al., 2002; Nagaraju et al., 2002; Archak et al., 2007)

ประชากรเมล็ด F_5 เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง KDML 105-9351(57D) ใช้เป็นพันธุ์แม่ กับ Basmati ใช้เป็นพันธุ์พ่อ ผลิตเมล็ด F_1 ถึง F_4 ใช้เทคนิคการคัดเลือกหนึ่งเมล็ดต่อต้น (single seed descent; SSD) โดยดำเนินการปลูกในเรือนกระจก จากนั้นปลูกต้น F_4 เพื่อผลิตเมล็ด F_5 ในแปลงนาทดลองของหน่วยความเป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยปลูกต้น F_4 สายพันธุ์ละ 1 แถว จำนวน 138 แถว ด้วยวิธีปักดำ 1 ต้นต่อหลุม ระยะห่างระหว่างต้นและแถว 25 x 25 ซม. ปล่อยต้น F_4 ผสมตัวเองได้เมล็ด F_5 เมื่อเมล็ดสุกแก่ สุ่มเก็บ 1 กอ/แถว ที่มีต้นข้าวต้นอื่นล้อมรอบทั้ง 4 ด้าน เก็บทุกแถวได้จำนวน 138 กอ จากนั้นนำเมล็ด F_5 ของแต่ละกอมาศึกษาขนาดเมล็ด

การศึกษาขนาดเมล็ดของพันธุ์แม่ (female parent) และพันธุ์พ่อ (male parent)

การศึกษาขนาดเมล็ดของพันธุ์แม่ คือ KDML 105-9351(57D) และพันธุ์พ่อ คือ Basmati โดยปลูกพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อพันธุ์ละ 30 กอ เมื่อเมล็ดสุกแก่ เก็บเกี่ยวแยกกอ จากนั้นนำเมล็ดทั้งหมดของแต่ละกอมาสุ่มเก็บเพียงกอละ 20 เมล็ด โดยไม่เลือก และสุ่มแยกแต่ละกอ เพื่อนำมาวัดขนาดเมล็ดข้าวกล้อง คือ ความยาว ความกว้าง และความหนา (ฟีโนไทป์) โดยวัดที่ตำแหน่งตรงกลางของเมล็ดทั้งสามด้านด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Mitutoyo Digital Vernier Caliper, Thailand) จากนั้นนำข้อมูลฟีโนไทป์ที่ได้ทั้งของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อมาวิเคราะห์ความแตกต่างของ 3 ลักษณะ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของฟีโนไทป์ ด้วยวิธี Two independent T-test

การศึกษาขนาดเมล็ด (ฟีโนไทป์) ของประชากรเมล็ด F_5

การศึกษาขนาดเมล็ดของประชากรเมล็ด F_5 โดยสุ่มเมล็ดข้าวกล้องจากแต่ละกอของประชากรเมล็ด F_5 มา 20 เมล็ด/กอ จำนวน 138 กอ วัดขนาดข้าวกล้อง คือ ความยาว ความกว้าง และความหนา (ฟีโนไทป์) จากนั้นนำข้อมูลฟีโนไทป์ที่ได้มาศึกษาระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่าง 3 ลักษณะ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ด้วยวิธี Pearson correlation นอกจากนี้ข้อมูลฟีโนไทป์ของประชากรเมล็ด F_5 นี้ จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ (เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ด) ในลำดับถัดไป

การค้นหาและออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ด

การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมขนาดเมล็ด โดยการสืบค้นข้อมูลจากบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องและจากฐานข้อมูลข้าวออนไลน์ในเว็บไซต์ต่าง ๆ ได้แก่ ฐานข้อมูล GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ฐานข้อมูล Gramene (http://www.gramene.org/markers/microsat/) ซึ่งได้รวบรวมเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ตำแหน่งต่าง ๆ บน 12 โครโมโซมของข้าวในตาราง supplementary table 18 ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จาก IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project [IRGSP], 2005) และฐานข้อมูล RAP-DB (https://rapdb.dna.affrc.go.jp/)

ขณะเดียวกันในงานวิจัยนี้ได้ทำการอ่านลำดับทั้งจีโนม (whole genome sequence; WGS) ของพันธุ์แม่ คือ KDML 105-9351(57D) และพันธุ์พ่อ คือ Basmati กับบริษัท Novogene Biotech ประเทศจีน การอ่านลำดับเบสถูกเทียบเข้ากับจีโนมอ้างอิงของข้าว คือ *Oryza sativa* ssp. *japonica* Nipponbare (Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0) (Tanaka et al., 2020) การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศสำหรับข้อมูลระดับจีโนมโดยห้างหุ้นส่วน จำกัด วอร์ด เมดิก ประเทศไทย จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ได้มาเปรียบเทียบบริเวณรหัส (exon) ของยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดทั้งวิถี เพื่อค้นหาตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ SNPs, insertions และ deletions ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ดังนี้ 1) แบบ nonsynonymous คือ ลำดับเบสเปลี่ยนส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปจากปกติ 2) แบบ stop-gain คือ ลำดับเบสเปลี่ยนส่งผลให้เกิดรหัสหยุดทำให้กรดอะมิโนสั้นกว่าปกติ 3) แบบ stop-loss คือ บริเวณรหัสหยุดเดิมมีลำดับเบสเปลี่ยนส่งผลให้กรดอะมิโนยาวกว่าปกติ และ 4) แบบ frameshift คือ ลำดับเบสเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากปกติส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจากตำแหน่งที่เกิด frameshift ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อกรดอะมิโนและอาจส่งผลต่อลักษณะที่ปรากฏหรือฟีโนไทป์ได้

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนชนิด Indel จากการเทียบลำดับเบสระหว่าง KDML 105-9351(57D) และ Basmati กับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดข้าวทั้งวิถี ซึ่งได้ออกแบบในส่วนของยีน ได้แก่ บริเวณ exon และ intron หรือที่

ยึดติดกับยีน ได้แก่ บริเวณ upstream ซึ่งครอบคลุมส่วน 5´UTR และโปรโมเตอร์ และบริเวณ downstream ซึ่งครอบคลุมส่วน 3´UTR เป็นต้น การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward primer ถูกออกแบบแล้วจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในทิศทาง (3´->5´) และ reverse primer ถูกออกแบบในทิศทางสวนกลับ โดยจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในทิศทาง (5´-> 3´) การออกแบบไพรเมอร์ใช้โปรแกรมออนไลน์ Primer3 (https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนนี้จะถูกนำไปตรวจสอบและคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อในลำดับถัดไป และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้ใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรเมล็ด F_5 ต่อไป

การตรวจสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเมล็ดข้าวของ KDML 105-9351(57D) และ Basmati และลูกผสม F_1 โดยใช้ชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA purification kit Cat no. K0512 ของบริษัท Thermo Scientific™ ดัดแปลงจากวิธีของ Fermentas นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น T100 Thermal cycler (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ด ปฏิกิริยาประกอบด้วย 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 องศาเซลเซียส 2 นาที ระยะที่ 2 Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ระยะที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 50-64 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิ annealing ที่ใช้ขึ้นอยู่กับเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิด) 1:30 นาที ระยะที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1:30 นาที โดยทำซ้ำจากระยะที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และระยะ Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยผสมสารสีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (INTRON Biotecnology, Korea) ลงในสารละลายเจลเข้มข้น 4% ก่อนเทเจล จากนั้นอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรสในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการบันทึกภาพด้วยเครื่อง Molecular Imager®Gel Doc™ XR+System (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟท์แวร์ Image Lab™ Software (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอต่างกัน โดยพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่จำเพาะกับ KDML 105-9351(57D) และ Basmati ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง KDML 105-9351(57D) และ Basmati ส่วนลูกผสม F_1 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมือน KDML 105-9351(57D) 1 แถบ และ Basmati 1 แถบ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้จะถูกนำไปใช้ตรวจสอบในประชากรเมล็ด F_5 เพื่อเป็นข้อมูลจีโนไทป์ในลำดับถัดไป

การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ด ของประชากรเมล็ด F_5

สุ่มเมล็ดข้าว 6 เมล็ด/กอ ของประชากรเมล็ด F_5 จำนวน 138 กอ มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอเช่นเดียวกับการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ด ที่คัดเลือกได้จากข้างต้น ปฏิกิริยาพีซีอาร์และการแยกขนาดดีเอ็นเอ ทำเช่นเดียวกับการตรวจสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดข้างต้น จากนั้นบันทึกผลโดยกำหนดให้จีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ คือ KDML 105-9351(57D) ให้สัญลักษณ์ KK ให้คะแนนเป็น 0 จีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ คือ Basmati ให้สัญลักษณ์ BB ให้คะแนนเป็น 2 และจีโนไทป์แบบ heterozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ เหมือนกับพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ ใช้สัญลักษณ์ BK ให้คะแนนเป็น 1

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดกับลักษณะความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ดของประชากรเมล็ด F_5

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ด (จีโนไทป์) กับลักษณะความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด (ฟีโนไทป์) ของประชากรเมล็ด F_5 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ R version 4.2.1 ประกอบด้วย

1) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ ด้วยวิธี One-way analysis of variance, completely random design (one-way ANOVA, CRD) และทดสอบแบบ Least significant difference (LSD) โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของฟีโนไทป์เมื่อจำแนกตามจีโนไทป์ คือ BB, BK และ KK

2) การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสองตัว ด้วยวิธี Pearson correlation เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) โดยค่าที่ได้อยู่ระหว่าง -1 ถึง 1 ถ้าค่า r เข้าใกล้ 1 แสดงว่าตัวแปรสองตัวนั้นมีความสัมพันธ์กันมากและมีทิศทางเดียวกัน หรือถ้าค่า r เข้าใกล้ -1 แสดงว่า ตัวแปรสองตัวนั้นมีความสัมพันธ์กันมากเช่นกันแต่มีทิศทางตรงข้ามกัน โดยการแปลผลระดับของความสัมพันธ์ ดังนี้ ค่า 0.00 ถึง ±0.20 มีความสัมพันธ์ต่ำมาก ค่า ±0.21 ถึง ±0.40 มีความสัมพันธ์ต่ำ ค่า ±0.41 ถึง ±0.60 มีความสัมพันธ์ปานกลาง, ค่า ±0.61 ถึง ±0.80 มีความสัมพันธ์สูง และ ค่า ±0.81 ถึง ±1.00 มีความสัมพันธ์สูงมาก (สุภมาส, 2556)

3) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ ด้วยการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) โดยวิธี Simple regression และ Multiple regression โดยใช้การเลือกตัวแปรโดยวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน (stepwise regression) เพื่อหาสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient; b) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) มีจุดมุ่งหมายเพื่ออธิบายหรือทำนายค่าตัวแปรตาม (ฟีโนไทป์) คือ ความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด โดยสามารถทำนายได้จากสมการถดถอยอย่างง่าย คือ $\hat{y} = a + bx$ เมื่อกำหนดให้ $\hat{y}$ คือ ค่าประมาณหรือค่าทำนายฟีโนไทป์, x คือ ค่าของตัวแปรอิสระหรือตัวแปรทำนาย (จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ด), a คือ ค่าคงที่ของสมการถดถอย โดยที่ a จะเป็นจุดตัด (intercept) แกน y ของสมการ, b คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของตัวแปรอิสระ (x) โดยที่ค่า b จะแสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าตัวแปร x ต่อค่า $\hat{y}$ ดังนี้ คือ ถ้าค่า x เปลี่ยนไป 1 หน่วย จะทำให้ค่า $\hat{y}$ เปลี่ยนไป b หน่วย และสมการถดถอยพหุคูณ คือ $\hat{y} = b_0+b_1x_1+b_2x_2+...+b_kx_k$ เมื่อกำหนดให้ $\hat{y}$ คือ ค่าประมาณหรือค่าทำนายของตัวแปรตาม โดยที่ b_0 คือ ค่าคงที่ของสมการถดถอย ส่วน x_1 x_2 และ x_k คือ ค่าของตัวแปรอิสระหรือตัวแปรทำนายที่ 1 2 และ k ตามลำดับ และ b_1 b_2 และ b_k คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระ x_1 x_2 และ x_k ตามลำดับ ซึ่ง R^2 คือ ค่าดัชนีที่แสดงว่าตัวแปร x ในสมการถดถอยสามารถอธิบายความผันแปรของตัวแปรตาม (ฟีโนไทป์) ได้มากน้อยเพียงใด โดยอธิบายว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีอิทธิพลต่อฟีโนไทป์ (ความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด) อยู่ร้อยละเท่าไหร่ ซึ่งคำนวณจาก $R^2 \times 100$ ส่วนที่เหลือจะเป็นอิทธิพลจากตัวแปรอื่นที่ไม่ได้นำมาวิเคราะห์ (สุทิน, 2560)

ผลการศึกษา

การศึกษาขนาดเมล็ดของพันธุ์แม่ (Female parent) และพันธุ์พ่อ (Male parent)

การศึกษาขนาดเมล็ดของพันธุ์แม่ คือ KDML 105-9351(57D) และพันธุ์พ่อ คือ Basmati เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความยาว ความกว้าง และความหนา ด้วยวิธี t-test พบว่าความยาวเมล็ดเฉลี่ยของ Basmati (7.78±0.15 มม.) ยาวกว่า KDML 105-9351(57D) (7.20±0.11 มม.) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งยาวกว่าเท่ากับ 0.58 มม. ขณะที่ความกว้างเมล็ดเฉลี่ยของ KDML 105-9351(57D) (2.12±0.03 มม.) กว้างกว่า Basmati (1.71±0.03 มม.) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งกว้างกว่าเท่ากับ 0.41 มม. และความหนาเมล็ดเฉลี่ยของ KDML 105-9351(57D) (1.74±0.02 มม.) หนากว่า Basmati (1.58±0.02 มม.) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งหนากว่าเท่ากับ 0.16 มม. (**Table 1**)

การศึกษาขนาดเมล็ด (ฟีโนไทป์) ของประชากรเมล็ด F_5

จากผลการวัดขนาดเมล็ดของประชากรเมล็ด F_5 จำนวน 138 กอ พบว่าความยาว กว้าง และหนาของเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 7.95±0.63 1.99±0.14 และ 1.63±0.06 มม. ตามลำดับ (**Table 1** และ **Figure 1**) จากการวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ของประชากรเมล็ด F_5 เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยวิธี Pearson correlation พบว่า ความกว้างและความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.699 แสดงว่าความกว้างและความหนาเมล็ดมีระดับความสัมพันธ์กันสูงในเชิงบวก ขณะที่ความยาวและความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมี

นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ -0.382 แสดงว่า ความยาวและความกว้างเมล็ดมีระดับความสัมพันธ์กันต่ำในเชิงลบ ส่วนความยาวและความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (**Table 2**)

Table 1 Three grain size traits of KDML 105-9351(57D) (female parent), Basmati (male parent) and F_5 seed population

Traits	Variety name	Range (mm)	Mean ± SD (mm)	*P* value[1/]	Distance (mm)
Grain length	KDML 105-9351(57D)	6.85 - 7.39	7.20 ± 0.11	0.000**	0.58
	Basmati	7.46 - 8.17	7.78 ± 0.15		
	F_5 seed population	6.79 - 9.29	7.95 ± 0.63		
Grain width	KDML 105-9351(57D)	2.05 - 2.21	2.12 ± 0.03	0.000**	0.41
	Basmati	1.65 - 1.76	1.71 ± 0.03		
	F_5 seed population	1.64 - 2.42	1.99 ± 0.14		
Grain thickness	KDML 105-9351(57D)	1.70 - 1.79	1.74 ± 0.02	0.000**	0.16
	Basmati	1.54 - 1.63	1.58 ± 0.02		
	F_5 seed population	1.49 - 1.79	1.63 ± 0.06		

[1/] T-test analysis of KDML 105-9351(57D) (female parent) and Basmati (male parent), ** indicating significance at p < 0.01, SD represents standard deviation, measurements are in millimeter (mm).

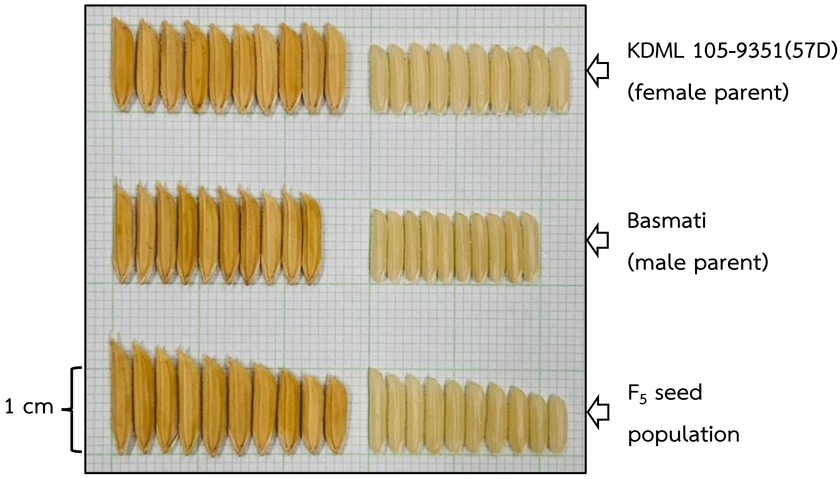

Figure 1 Paddy and brown rice grains of the female parent was KDML 105-9351 (57D), the male parent was Basmati, and the grains shown belong to their F_5 seed population.

Table 2 Correlation coefficients (r) were calculated using Pearson correlation analysis among three grain size traits of the F_5 seed population

Correlation coefficient (r)	Grain length	Grain width	Grain thickness
Grain length	1.000		
Grain width	-0.382**	1.000	
Grain thickness	0.029ns	0.699**	1.000

** indicating significance at p<0.01, ns indicates non-significance.

การค้นหาและการออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ด

งานวิจัยนี้ได้ศึกษายีน จำนวน 83 ตำแหน่ง ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมขนาดเมล็ดข้าวทั้งวิถี จากการสืบค้นข้อมูลยีนดังกล่าว และจากการอ่านลำดับทั้งจีโนม (WGS) ของพันธุ์แม่ คือ KDML 105-9351(57D) และพันธุ์พ่อ คือ Basmati จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อบริเวณรหัสของยีนที่มีการกลายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ SNP, insertion และ deletion ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน จึงคัดเลือกเหลือ 34 ตำแหน่ง ซึ่งมี 78 เครื่องหมาย ดังนี้

ผลการสืบค้นข้อมูลจากบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องและจากฐานข้อมูลข้าวออนไลน์ พบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน 10 ตำแหน่ง ซึ่งมี 36 เครื่องหมาย ดังนี้ บนโครโมโซมที่ 2 ได้แก่ ยีน *GW2* และ *GS2* จำนวน 1 และ 8 เครื่องหมาย ตามลำดับ บนโครโมโซมที่ 3 ได้แก่ ยีน *GS3* และ *GL3.1* จำนวน 15 และ 3 เครื่องหมาย ตามลำดับ บนโครโมโซม 4 ได้แก่ ยีน *qGL4b* จำนวน 1 เครื่องหมาย บนโครโมโซม 5 ได้แก่ ยีน *GS5* จำนวน 1 เครื่องหมาย บนโครโมโซม 7 ได้แก่ ยีน *qGL7-2* และ *GL7* จำนวน 1 และ 4 เครื่องหมาย ตามลำดับ บนโครโมโซม 8 ได้แก่ ยีน *GW8* จำนวน 1 เครื่องหมาย และบนโครโมโซม 12 ได้แก่ ยีน *qGL12* จำนวน 1 เครื่องหมาย และการออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ที่จำเพาะกับยีนแต่ละตำแหน่ง สามารถออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน 24 ตำแหน่ง ซึ่งมี 42 เครื่องหมาย ประกอบด้วย เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 5 ตำแหน่ง ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน ได้แก่ ยีน *RGB1 GW5 GW6a GS7* และ *qPE9* และเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 19 ตำแหน่ง ที่ยึดติดกับยีน ได้แก่ *BG3 OsBRI1 FLR2 GL1 LG1 SMG1 An-1 GL4 OsGSK2 GW5.1 OFP19 SMOS1 GS6 TGW6 GLW7 GS9 qTGW9 qGL10* และ *GW10*

การตรวจสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ด ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ และการนำไปใช้ตรวจสอบประชากรเมล็ด F_5

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนทั้ง 34 ตำแหน่ง (78 เครื่องหมาย) ข้างต้น มาตรวจสอบและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ สามารถคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 29 ตำแหน่ง (**Table 3**) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ co-dominance คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกระหว่าง homozygous และ heterozygous ได้ โดยคัดเลือกยีนละหนึ่งเครื่องหมาย ดังนี้ บนโครโมโซมที่ 1 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *BG3 OsBRI1 FLR2* และ *GL1* (**Figure 2a-d**) บนโครโมโซมที่ 2 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *LG1* และ *SMG1* (**Figure 2e-f**) บนโครโมโซมที่ 3 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RGB1* (**Figure 2g**) บนโครโมโซมที่ 4 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *An-1 qGL4b* และ *GL4* (**Figure 2h-j**) บนโครโมโซมที่ 5 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GS5 GW5 OsGSK2 GW5.1 OFP19* และ *SMOS1* (**Figure 2k-p**) บนโครโมโซมที่ 6 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GS6 TGW6* และ *GW6a* (**Figure 2q-s**) บนโครโมโซมที่ 7 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GLW7 qGL7-2 GL7* และ *GS7* (**Figure 2t-w**) บนโครโมโซมที่ 9 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qPE9 GS9* และ *qTGW9* (**Figure 2x-z**) บนโครโมโซมที่ 10 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL10* และ *GW10* (**Figure 2aa-ab**) และบนโครโมโซมที่ 12 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL12* (**Figure 2ac**)

Table 3 Detailed information for the 29 DNA markers of genes involved in controlling rice grain size and the insertion/deletion (indel) positions for the design of new markers

No.	Genes name	Gene ID	Protein function	Chr.	Reference of Genes	Type of mutation	Annotation	Basmati	KDML 105-9351(57D)	Markers name	Indel position	Distance base	Sources of DNA markers
1	*BG3*	Os01g0680200	Purine permease	1	Yin et al. (2020)	nonsyn.[2/]	exon1:c.G64A:p.A22T exon1:c.C1097A:p.A366D	A C	G A	BG3-up1	27,991,430	11 bp	new design
2	*OsBRI1*	Os01g0718300	BR receptor kinase	1	Yamamuro et al. (2000)	nonsyn.[2/]	exon1:c.G145A:p.G49S exon1:c.G635A:p.G212D	A G	G A	OsBRI1-top1	29,922,992	11 bp	new design
3	*FLR2*	Os01g0769700	Receptor-like kinase	1	Wang et al. (2021)	nonsyn.[2/]	exon1:c.G787A:p.D263N	A	G	FLR2-up1	32,461,601	17 bp	new design
4	*GL1*	Os01g0858350	Similar to cytochrome P450	1	Zhang et al. (2021)	nonsyn.[2/]	exon1:c.T182A:p.F61Y	A	T	GL1-3UTR1	37,097,372	23 bp	new design
5	*LG1*	Os02g0244300	Ubiquitin specific protease	2	Shi et al. (2019)	nonsyn.[2/]	exon3:c.T190A:p.L64M exon3:c.C274T:p.H92Y	T C	A T	LG1-5UTR1	8,135,216	12 bp	new design
6	*SMG1*	Os02g0787300	Mitogen activated protein kinase	2	Duan et al. (2014)	nonsyn.[2/]	exon1:c.A41T:p.Q14L	T	A	SMG1-top1	33,441,716	10 bp	new design
7	*RGB1*	Os03g0669200	Gβ subunit	3	Li et al. (2019a)	nonsyn.[2/]	exon4:c.A650T:p.N217I	A	T	RGB1-In2-2	26,403,784	52 bp	new design
8	*An-1*	Os04g0350700	Basic helix-loop-helix protein	4	Luo et al. (2013)	frameshift deletion[1/]	exon3:c.254delG:p.R85fs	G	-	An-1-down1	16,742,550	18 bp	new design
9	*qGL4b*	LOC_Os04g32730	unknown[3/]	4	Feng et al. (2016)	unknown[3/]	unknown[3/]	unknown[3/]		RM5586	19,900,128	AC(8)	Feng et al. (2016)
10	*GL4*	Os04g0670900	GT-1-like trihelix transcription factor	4	Wu et al. (2017)	nonsyn.[2/]	exon1:c.T266G:p.V89G,	T	T	GL4-low1	34,267,996	30 bp	new design
11	*GS5*	Os05g0158500	Putative serine carboxypeptidase	5	Xu et al. (2015)	nonsyn.[2/]	exon9:c.A1248C:p.E416D, exon2:c.C382A:p.Q128K, exon2:c.A380C:p.N127T,	A C A	A C A	RM574	3,450,959	CT(3)	Ngangkham et al. (2018)
12	*GW5*	Os05g0187500	Calmodulin binding protein	5	Duan et al. (2017)	unknown	exon3:c.C1211G:p.A404G	G	C	GW5-ex3-1	5,366,484	15 bp	new design
13	*OsGSK2*	Os05g0207500	GSK3/SHAGGY-like kinase	5	Tong et al. (2012)	nonsyn.[2/]	exon6:c.A637G:p.T213A exon12:c.G1201A:p.G401R exon12:c.A1180G:p.T394A exon12:c.G1169A:p.R390Q	A G A G	G A G A	OsGSK2-top1	6,656,703	15 bp	new design
14	*GW5.1*	Os05g0317700	Similar to Resistance protein candidate	5	Zhang et al. (2021)	nonsyn.[2/], frameshift deletion[1/]	exon2:c.G70T:p.A24S exon2:c.G1163A:p.R388K exon2:c.A1643G:p.H548R exon2:c.T1955C:p.F652S exon2:c.1011_1012del:p.I337fs	G G A C TT	T A G T -	GW5.1-top1	14,714,148	10 bp	new design

Table 3 Detailed information for the 29 DNA markers of genes involved in controlling rice grain size and the insertion/deletion (indel) positions for the design of new markers (continued)

No.	Genes name	Gene ID	Protein function	Chr.	Reference of Genes	Type of mutation	Annotation	Basmati	KDML 105-9351(57D)	Markers name	Indel position	Distance base	Sources of DNA markers
15	*OFP19*	Os05g0324600	OVATE family protein	5	Yang et al. (2018)	nonsyn.[2/]	exon1:c.T101G:p.M34R	G	T	OFP19-5UTR1	15,070,331	8 bp	new design
							exon1:c.T514C:p.C172R	T	C				
							exon1:c.C319A:p.Q107K	C	A				
16	*SMOS1*	Os05g0389000	AP2-type transcription factor	5	Aya et al. (2014)	nonsyn.[2/]	exon5:c.C521T:p.P174L	T	C	SMOS1-top1	18,789,537	7 bp	new design
17	*GS6*	Os06g0127800	GRAS family protein	6	Sun et al. (2013)	nonsyn.[2/]	exon1:c.A382G:p.T128A	G	A	GS6-top1	1,464,659		new design
							exon1:c.G1723C:p.G575R	C	G				
18	*TGW6*	Os06g0623700	Protein with IAA-glucose hydrolase activity	6	Ishimaru et al. (2013)	nonsyn.[2/]	exon1:c.C546T:p.A182	C	T	TGW6-pro1	25,094,225	9 bp	new design
							exon1:c.T650G:p.V347A	T	G				
							exon1:c.G690T:p.M230I	G	T				
19	*GW6a*	Os06g0650300	GNAT-like Protein	6	Song et al. (2015)	nonsyn.[2/]	exon1:c.A214G:p.S72G	A	G	GW6a-ex1-1	26,593,262	6 bp	new design
20	*GLW7*	Os07g0505200	Squamosa promoter-binding like protein	7	Segami et al. (2017)	nonsyn.[2/]	exon2:c.A593G:p.D198G	G	A	GLW7-3UTR	19,100,097	8 bp	new design
21	*qGL7-2*	Os07g0603100	unknown	7	Shao et al. (2010)	nonsyn.[2/]	exon4:c.C479T:p.S160F	T	C	indel 1	24,658,224	11 bp	Shao et al. (2010)
							exon10:c.A1351T:p.M451L	A	T				
							exon10:c.C1240T:p.R414W	C	T				
22	*GL7*	Os07g0603300	TRM-containing protein	7	Zhang et al. (2020)	nonsyn.[2/]	exon3:c.A1858G:p.S620G	G	A	InDel1	24,669,234	11 bp	Zhang et al. (2020)
							exon3:c.C1552T:p.P518S	T	C				
							exon3:c.C1815G:p.N605K	G	C				
							exon3:c.G1384T:p.A462S	G	T				
23	*GS7*	OSJNBb0039M16.23	unknown[3/]	7	Ngangkham et al. (2018)	unknown[3/]	unknown[3/]	-	142 bp insertion	newFMGS7	24,678,280	142 bp	new design
24	*qPE9*	Os09g0441900	Gγ subunit	9	Li et al. (2019b)	nonsyn.[2/]	exon4:c.A185G:p.Y62C	A	G	qPE9-in4-1	16,414,584	21 bp	new design
							exon4:c.G482A:p.S161N	G	A				
							exon4:c.T554A:p.L185H	T	A				
							exon4:c.C704G:p.S235W	C	G				
							exon4:c.T841A:p.C281S	T	A				
25	*GS9*	Os09g0448500	Transcriptional activator	9	Zhao et al. (2018)	nonsyn.[2/]	exon4:c.G667T:p.A223S	T	G	GS9-top1	16,762,809	15 bp	new design
							exon4:c.C749T:p.P250L	C	T				
							exon4:c.G778C:p.A260P	G	C				

Table 3 Detailed information for the 29 DNA markers of genes involved in controlling rice grain size and the insertion/deletion (indel) positions for the design of new markers (continued)

No.	Genes name	Gene ID	Protein function	Chr.	Reference of Genes	Type of mutation	Annotation	Basmati	KDML 105-9351(57D)	Markers name	Indel position	Distance base	Sources of DNA markers
26	*qTGW9*	Os09g0544400	Similar to glutathione	9	Niu et al. (2021)	nonsyn.2/	exon3:c.C724T:p.R242C	C	T	qTGW9-up1	21,516,173	30 bp	new design
							exon3:c.C815T:p.T272M	C	T				
							exon3:c.G1262C:p.G421A	G	C				
							exon3:c.G1742A:p.R581H	G	A				
							exon3:c.G2787C:p.M929I	G	C				
							exon3:c.C3644T:p.S1215F	C	T				
							exon3:c.T4099C:p.F1367L	T	C				
							exon3:c.T4748C:p.F1583S	T	C				
							exon3:c.A4760G:p.K1587R	A	G				
							exon3:c.A5185T:p.I1729F	A	T				
							exon3:c.T5218A:p.S1740T	T	A				
							exon3:c.G5726T:p.S1909I	G	T				
							exon3:c.A6281C:p.E2094A	A	C				
							exon3:c.C5003G:p.A1668G	C	G				
							exon3:c.C5009T:p.P1670L	C	T				
							exon3:c.C5251G:p.P1751A	C	G				
							exon3:c.C5443T:p.P1815S	C	T				
							exon3:c.A5450G:p.D1817G	A	G				
27	*qGL10*	Os10g0400100	Methionyl-tRNA synthetase	10	Niu et al. (2021)	nonsyn.2/	exon1:c.T94G:p.S32A	T	G	qGL10-down1	13,491,628	19 bp	new design
							exon1:c.T229G:p.Y77D	T	G				
							exon2:c.A931C:p.I311L	A	C				
							exon3:c.T1160C:p.L387P	T	C				
28	*GW10*	Os10g0515400	Cytochrome P450 subfamily protein	10	Zhan et al. (2021)	nonsyn.2/	exon2:c.G1642T:p.V548L	T	G	GW10-down2	19,889,397	13 bp	new design
							exon2:c.A1033G:p.T345A	A	G				
29	*qGL12*	Os12g0606000	Similar to Protein kinase domain containing	12	Feng et al. (2016)	nonsyn.2/	exon1:c.C449T:p.P150L	nbs4/	nbs4/	RM2854	23,593,990		Feng et al. (2016)
							exon3:c.A1879G:p.R627G	nbs4/	G				

1/ Frameshift deletion was an indel mutation that altered the open reading frame due to a deletion, 2/ nonsyn. stands for "Nonsynonymous" refers to a single nucleotide mutation that results in a changed amino acid sequence, 3/ unknown means that there is no report or clear information available at the moment, 4/ nbs stands for "no base sequence" indicating the absence of a DNA sequence, Chr. stands for chromosome, c. stands for complementary DNA, p. refers to protein, and A, T, C, and G base are the DNA base pairs that form the genetic code in organisms.

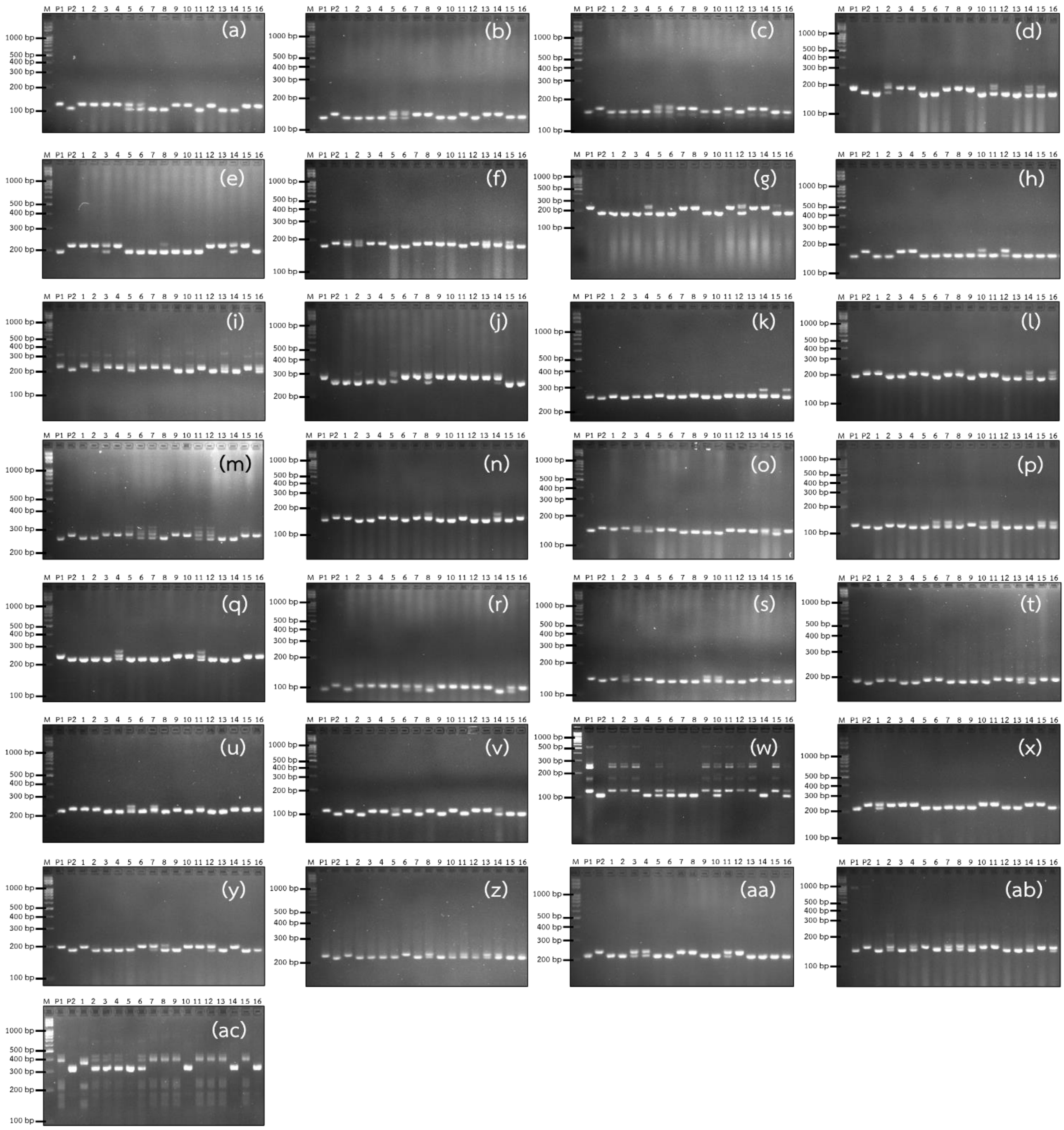

Figure 2 PCR amplified fragments of the 29 DNA markers located at or linked to the genes controlling rice grain size. (a) *BG3*; (b) *OsBRI1;* (c) *FLR2;* (d) *GL1*; (e) *LG1;* (f) *SMG1;* (g) *RGB1;* (h) *An-1;* (i) *qGL4b;* (j) *GL4;* (k) *GS5;* (l) *GW5;* (m) *OsGSK2;* (n) *GW5.1;* (o) *OFP19;* (p) *SMOS1;* (q) *GS6;* (r) *TGW6;* (s) *GW6a;* (t) *GLW7;* (u) *qGL7-2;* (v) *GL7;* (w) *GS7;* (x) *qPE9;* (y) *GS9;* (z) *qTGW9;* (aa) *qGL10;* (ab) *GW10* and (ac) *qGL12*. Lane M represented a 100 bp DNA ladder, Lane P1 represented KDML 105-9351(57D), Lane P2 represented Basmati, and Lanes 1-16 contained samples from the F_5 seed population.

เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนทั้ง 29 ตำแหน่งข้างต้น ถูกนำมาใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากรเมล็ด F_5 จำนวน 138 กอ พบว่า ทั้ง 29 ตำแหน่ง **(Table 3)** ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถแยกกลุ่มจีโนไทป์ของประชากรเมล็ด F_5 ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ คือ KDML 105-9351(57D) กำหนดสัญลักษณ์เป็น KK ให้คะแนนเป็น 0 กลุ่มที่ 2 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ คือ Basmati กำหนดสัญลักษณ์เป็น BB ให้คะแนนเป็น 2 และกลุ่มที่ 3 มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ เหมือนพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ กำหนดสัญลักษณ์เป็น BK ให้คะแนนเป็น 1 **(Figure 2)**

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดกับลักษณะความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด ของประชากรเมล็ด F_5

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 29 ตำแหน่ง กับฟีโนไทป์ คือ ลักษณะความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด ของประชากรเมล็ด F_5 ด้วยวิธี ANOVA เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของฟีโนไทป์ เมื่อจำแนกตามจีโนไทป์ ได้แก่ BB BK และ KK ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนแต่ละตำแหน่ง หากพบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของฟีโนไทป์ แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ เมื่อพิจารณาลักษณะความยาวเมล็ด พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 10 ตำแหน่ง มีอย่างน้อย 1 คู่ ที่มีค่าเฉลี่ยของความยาวเมล็ดแตกต่างกัน โดยจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *SMG1 qGL7-2 GL7 GS7* และ *qTGW9* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนอีก 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL4 GS5 TGW6 GLW7* และ *GW10* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (**Table 4**) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหลืออีก 19 ตำแหน่ง พบว่า ค่าเฉลี่ยของความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แสดงว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวเมล็ด

สำหรับลักษณะความกว้างเมล็ด พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 5 ตำแหน่ง มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 คู่ ที่มีค่าเฉลี่ยของความกว้างเมล็ดแตกต่างกัน โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *qGL7-2 GL7* และ *GS7* กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนอีก 2 ตำแหน่ง ได้แก่ *OFP19* และ *qTGW9* กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (**Table 5**) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหลืออีก 24 ตำแหน่ง พบว่า ค่าเฉลี่ยของความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แสดงว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์กับความกว้างเมล็ด

ส่วนลักษณะความหนาเมล็ด พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 9 ตำแหน่ง มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 คู่ ที่มีค่าเฉลี่ยของความหนาเมล็ดแตกต่างกัน โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *TGW6 GW6a qGL7-2 GL7* และ *GS7* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนอีก 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL1, GL4, qTGW9* และ *GW10* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (**Table 6**) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหลืออีก 20 ตำแหน่ง พบว่า ค่าเฉลี่ยของความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แสดงว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์กับความหนาเมล็ด

นอกจากนี้ยังพบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2 GL7 GS7* และ *qTGW9* มีความสัมพันธ์กับทั้ง 3 ลักษณะ ขณะที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL4 TGW6* และ *GW10* มีความสัมพันธ์กับความยาว และความหนาเมล็ด ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *SMG1 GS5* และ *GLW7* มีความสัมพันธ์เฉพาะกับความยาวเมล็ด ทำนองเดียวกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OFP19* มีความสัมพันธ์เฉพาะกับความกว้างเมล็ด และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL1* และ *GW6a* มีความสัมพันธ์กับความหนาเมล็ดเท่านั้น (**Table 4-6**)

Table 4 ANOVA analysis of the 29 DNA markers located at or linked to the genes and their association with the rice grain length trait in the F_5 seed population

DNA markers of genes	Genotype	Grain length Mean	SD	*P* value
	BB	7.890^{a}	0.598	
BG3	BK	7.920^{a}	0.623	0.404^{ns}
	KK	8.052^{a}	0.670	
	BB	7.951^{a}	0.613	
OsBRI1	BK	7.729^{a}	0.467	0.331^{ns}
	KK	8.013^{a}	0.684	
	BB	7.901^{a}	0.585	
FLR2	BK	7.984^{a}	0.703	0.650^{ns}
	KK	8.009^{a}	0.657	
	BB	7.966^{a}	0.666	
GL1	BK	7.812^{a}	0.619	0.630^{ns}
	KK	7.972^{a}	0.615	
	BB	7.916^{a}	0.578	
LG1	BK	8.119^{a}	0.552	0.535^{ns}
	KK	7.938^{a}	0.676	
	BB	8.130^{a}	0.634	
SMG1	BK	8.112^{a}	0.383	0.000^{**}
	KK	7.608^{b}	0.565	
	BB	7.862^{a}	0.602	
RGB1	BK	7.959^{a}	0.598	0.385^{ns}
	KK	8.027^{a}	0.664	
	BB	7.908^{a}	0.592	
An-1	BK	7.953^{a}	0.647	0.901^{ns}
	KK	7.969^{a}	0.641	

DNA markers of genes	Genotype	Grain length Mean	SD	*P* value
	BB	7.925^{a}	0.590	
qGL4b	BK	8.005^{a}	0.721	0.897^{ns}
	KK	7.949^{a}	0.629	
	BB	7.774^{b}	0.634	
GL4	BK	8.249^{a}	0.476	0.013^{*}
	KK	8.002^{a}	0.625	
	BB	7.778^{b}	0.552	
GS5	BK	8.045^{ab}	0.660	0.047^{*}
	KK	8.053^{a}	0.651	
	BB	7.878^{a}	0.582	
GW5	BK	8.032^{a}	0.699	0.480^{ns}
	KK	7.995^{a}	0.647	
	BB	7.982^{a}	0.625	
OsGSK2	BK	7.946^{a}	0.580	0.852^{ns}
	KK	7.916^{a}	0.653	
	BB	7.864^{a}	0.627	
GW5.1	BK	8.221^{a}	0.481	0.063^{ns}
	KK	7.929^{a}	0.659	
	BB	7.917^{a}	0.620	
OFP19	BK	8.210^{a}	0.512	0.189^{ns}
	KK	7.909^{a}	0.658	

DNA markers of genes	Genotype	Grain length Mean	SD	*P* value
	BB	7.904^{a}	0.647	
SMOS1	BK	8.002^{a}	0.455	0.761^{ns}
	KK	7.961^{a}	0.722	
	BB	7.933^{a}	0.621	
GS6	BK	7.871^{a}	0.641	0.630^{ns}
	KK	8.023^{a}	0.641	
	BB	7.807^{b}	0.581	
TGW6	BK	8.036^{ab}	0.729	0.041^{*}
	KK	8.088^{a}	0.616	
	BB	7.843^{a}	0.597	
GW6a	BK	7.968^{a}	0.670	0.134^{ns}
	KK	8.082^{a}	0.631	
	BB	8.006^{ab}	0.592	
GLW7	BK	8.238^{a}	0.700	0.031^{*}
	KK	7.841^{b}	0.606	
	BB	8.530^{a}	0.423	
qGL7-2	BK	7.986^{b}	0.399	0.000^{**}
	KK	7.543^{c}	0.433	
	BB	8.557^{a}	0.416	
GL7	BK	8.009^{b}	0.382	0.000^{**}
	KK	7.543^{c}	0.433	

DNA markers of genes	Genotype	Grain length Mean	SD	*P* value
	BB	8.580^{a}	0.401	
GS7	BK	8.000^{b}	0.477	0.000^{**}
	KK	7.551^{c}	0.439	
	BB	7.980^{a}	0.611	
qPE9	BK	8.100^{a}	0.549	0.091^{ns}
	KK	7.820^{a}	0.674	
	BB	7.914^{a}	0.626	
GS9	BK	8.206^{a}	0.436	0.122^{ns}
	KK	7.919^{a}	0.661	
	BB	7.778^{b}	0.535	
qTGW9	BK	8.227^{a}	0.535	0.007^{**}
	KK	7.915^{b}	0.636	
	BB	8.067^{a}	0.666	
qGL10	BK	7.971^{a}	0.619	0.418^{ns}
	KK	7.891^{a}	0.615	
	BB	7.761^{b}	0.601	
GW10	BK	8.123^{a}	0.608	0.024^{*}
	KK	8.007^{a}	0.630	
	BB	8.015^{a}	0.649	
qGL12	BK	7.889^{a}	0.523	0.564^{ns}
	KK	7.910^{a}	0.684	

** indicating significance at $p<0.01$, * indicates significance at $p<0.05$, ^{ns} indicates non-significance, SD represented the standard deviation of the phenotype, BB represented individuals homozygous for Basmati allele, BK represented individuals heterozygous for Basmati and KDML 105-9351(57D) alleles, and KK represented individuals homozygous for KDML 105-9351(57D) allele, $^{a, b, c}$ were ranked using the LSD test.

Table 5 ANOVA analysis of the 29 DNA markers located at or linked to the genes and their association with the rice grain width trait in the F_5 seed population

DNA markers of genes	Genotype	Grain width Mean	SD	*P* value
	BB	1.988^{a}	0.139	
BG3	BK	1.975^{a}	0.155	0.774^{ns}
	KK	1.999^{a}	0.132	
	BB	1.977^{a}	0.134	
OsBRI1	BK	2.055^{a}	0.156	0.158^{ns}
	KK	1.988^{a}	0.142	
	BB	1.984^{a}	0.140	
FLR2	BK	1.969^{a}	0.156	0.528^{ns}
	KK	2.007^{a}	0.130	
	BB	1.986^{a}	0.134	
GL1	BK	1.993^{a}	0.154	0.204^{ns}
	KK	1.988^{a}	0.137	
	BB	1.997^{a}	0.149	
LG1	BK	2.009^{a}	0.125	0.658^{ns}
	KK	1.979^{a}	0.137	
	BB	1.972^{a}	0.132	
SMG1	BK	2.007^{a}	0.175	0.341^{ns}
	KK	2.007^{a}	0.134	
	BB	2.009^{a}	0.135	
RGB1	BK	1.995^{a}	0.145	0.282^{ns}
	KK	1.967^{a}	0.141	
	BB	2.001^{a}	0.141	
An-1	BK	1.986^{a}	0.147	0.839^{ns}
	KK	1.983^{a}	0.136	

DNA markers of genes	Genotype	Grain width Mean	SD	*P* value
	BB	1.998^{a}	0.154	
qGL4b	BK	2.015^{a}	0.131	0.474^{ns}
	KK	1.977^{a}	0.134	
	BB	2.007^{a}	0.136	
GL4	BK	1.996^{a}	0.136	0.413^{ns}
	KK	1.973^{a}	0.143	
	BB	1.984^{a}	0.131	
GS5	BK	1.982^{a}	0.134	0.870^{ns}
	KK	1.996^{a}	0.151	
	BB	1.994^{a}	0.148	
GW5	BK	1.952^{a}	0.115	0.374^{ns}
	KK	1.999^{a}	0.140	
	BB	1.983^{a}	0.140	
OsGSK2	BK	1.945^{a}	0.164	0.208^{ns}
	KK	2.009^{a}	0.128	
	BB	2.010^{a}	0.125	
GW5.1	BK	1.936^{a}	0.164	0.095^{ns}
	KK	1.987^{a}	0.140	
	BB	2.000^{a}	0.127	
OFP19	BK	1.908^{b}	0.154	0.037*
	KK	2.000^{a}	0.144	

DNA markers of genes	Genotype	Grain width Mean	SD	*P* value
	BB	2.007^{a}	0.130	
SMOS1	BK	1.968^{a}	0.162	0.413^{ns}
	KK	1.984^{a}	0.131	
	BB	1.978^{a}	0.145	
GS6	BK	1.999^{a}	0.130	0.624^{ns}
	KK	2.003^{a}	0.134	
	BB	1.966^{a}	0.126	
TGW6	BK	1.974^{a}	0.179	0.089^{ns}
	KK	2.021^{a}	0.135	
	BB	1.972^{a}	0.130	
GW6a	BK	1.997^{a}	0.160	0.419^{ns}
	KK	2.007^{a}	0.140	
	BB	1.963^{a}	0.146	
GLW7	BK	1.968^{a}	0.117	0.185^{ns}
	KK	2.009^{a}	0.140	
	BB	1.865^{c}	0.098	
qGL7-2	BK	1.974^{b}	0.089	0.000**
	KK	2.076^{a}	0.101	
	BB	1.862^{c}	0.098	
GL7	BK	1.963^{b}	0.091	0.000**
	KK	2.076^{a}	0.101	

DNA markers of genes	Genotype	Grain width Mean	SD	*P* value
	BB	1.866^{c}	0.096	
GS7	BK	1.947^{b}	0.114	0.000**
	KK	2.077^{a}	0.103	
	BB	1.982^{a}	0.117	
qPE9	BK	1.965^{a}	0.158	0.285^{ns}
	KK	2.010^{a}	0.140	
	BB	1.993^{a}	0.122	
GS9	BK	1.930^{a}	0.163	0.197^{ns}
	KK	1.999^{a}	0.147	
	BB	1.992^{ab}	0.103	
qTGW9	BK	1.933^{b}	0.146	0.021*
	KK	2.015^{a}	0.149	
	BB	1.986^{a}	0.134	
qGL10	BK	1.993^{a}	0.154	0.979^{ns}
	KK	1.988^{a}	0.137	
	BB	1.956^{a}	0.131	
GW10	BK	1.982^{a}	0.130	0.056^{ns}
	KK	2.021^{a}	0.147	
	BB	1.993^{a}	0.142	
qGL12	BK	1.997^{a}	0.131	0.754^{ns}
	KK	1.975^{a}	0.146	

** indicating significance at p<0.01, * indicates significance at p<0.05, ^{ns} indicates non-significance, SD represented the standard deviation of the phenotype, BB represented individuals homozygous for Basmati allele, BK represented individuals heterozygous for Basmati and KDML 105-9351(57D) alleles, and KK represented individuals homozygous for KDML 105-9351(57D) allele, $^{a, b, c}$ were ranked using the LSD test.

Table 6 ANOVA analysis of the 29 DNA markers located at or linked to the genes and their association with the rice grain thickness trait in the F_5 seed population

DNA markers of genes	Genotype	Grain thickness Mean	SD	*P* value
BG3	BB	1.630^{a}	0.065	
	BK	1.619^{a}	0.054	0.070^{ns}
	KK	1.650^{a}	0.059	
OsBRI1	BB	1.628^{a}	0.060	
	BK	1.637^{a}	0.061	0.459^{ns}
	KK	1.642^{a}	0.064	
FLR2	BB	1.627^{a}	0.062	
	BK	1.626^{a}	0.055	0.120^{ns}
	KK	1.650^{a}	0.062	
GL1	BB	1.621^{b}	0.063	
	BK	1.664^{a}	0.073	0.025^{*}
	KK	1.639^{ab}	0.052	
LG1	BB	1.629^{a}	0.063	
	BK	1.650^{a}	0.060	0.495^{ns}
	KK	1.635^{a}	0.060	
SMG1	BB	1.632^{a}	0.062	
	BK	1.645^{a}	0.067	0.692^{ns}
	KK	1.632^{a}	0.059	
RGB1	BB	1.633^{a}	0.055	
	BK	1.643^{a}	0.078	0.659^{ns}
	KK	1.630^{a}	0.059	
An-1	BB	1.640^{a}	0.059	
	BK	1.627^{a}	0.055	0.636^{ns}
	KK	1.635^{a}	0.066	

DNA markers of genes	Genotype	Grain thickness Mean	SD	*P* value
qGL4b	BB	1.636^{a}	0.054	
	BK	1.647^{a}	0.059	0.508^{ns}
	KK	1.630^{a}	0.066	
GL4	BB	1.645^{a}	0.066	
	BK	1.655^{a}	0.055	0.027^{*}
	KK	1.620^{b}	0.056	
GS5	BB	1.629^{a}	0.056	
	BK	1.634^{a}	0.054	0.706^{ns}
	KK	1.639^{a}	0.068	
GW5	BB	1.638^{a}	0.060	
	BK	1.620^{a}	0.048	0.445^{ns}
	KK	1.636^{a}	0.067	
OsGSK2	BB	1.638^{a}	0.062	
	BK	1.624^{a}	0.077	0.683^{ns}
	KK	1.633^{a}	0.055	
GW5.1	BB	1.635^{a}	0.053	
	BK	1.639^{a}	0.085	0.833^{ns}
	KK	1.630^{a}	0.060	
OFP19	BB	1.636^{a}	0.051	
	BK	1.623^{a}	0.083	0.730^{ns}
	KK	1.636^{a}	0.066	

DNA markers of genes	Genotype	Grain thickness Mean	SD	*P* value
SMOS1	BB	1.642^{a}	0.063	
	BK	1.614^{a}	0.055	0.066^{ns}
	KK	1.640^{a}	0.061	
GS6	BB	1.626^{a}	0.059	
	BK	1.647^{a}	0.061	0.233^{ns}
	KK	1.642^{a}	0.066	
TGW6	BB	1.614^{b}	0.051	
	BK	1.622^{b}	0.061	0.000^{**}
	KK	2.622^{a}	0.062	
GW6a	BB	1.619^{b}	0.056	
	BK	1.628^{b}	0.057	0.004^{**}
	KK	1.657^{a}	0.065	
GLW7	BB	1.627^{a}	0.059	
	BK	1.642^{a}	0.058	0.605^{ns}
	KK	1.636^{a}	0.064	
qGL7-2	BB	1.604^{b}	0.056	
	BK	1.622^{b}	0.061	0.000^{**}
	KK	1.657^{a}	0.056	
GL7	BB	1.602^{b}	0.056	
	BK	1.626^{ab}	0.058	0.000^{**}
	KK	1.657^{a}	0.056	

DNA markers of genes	Genotype	Grain thickness Mean	SD	*P* value
GS7	BB	1.604^{b}	0.054	
	BK	1.622^{b}	0.066	0.000^{**}
	KK	1.656^{a}	0.056	
qPE9	BB	1.646^{a}	0.062	
	BK	1.618^{a}	0.062	0.112^{ns}
	KK	1.637^{a}	0.059	
GS9	BB	1.637^{a}	0.061	
	BK	1.635^{a}	0.069	0.665^{ns}
	KK	1.621^{a}	0.061	
qTGW9	BB	1.632^{ab}	0.053	
	BK	1.612^{b}	0.063	0.033^{*}
	KK	1.646^{a}	0.063	
qGL10	BB	1.653^{a}	0.066	
	BK	1.634^{a}	0.063	0.123^{ns}
	KK	1.626^{a}	0.058	
GW10	BB	1.615^{b}	0.057	
	BK	1.636^{ab}	0.059	0.014^{*}
	KK	1.650^{a}	0.063	
qGL12	BB	1.641^{a}	0.064	
	BK	1.641^{a}	0.061	0.129^{ns}
	KK	1.618^{a}	0.057	

** indicating significance at $p<0.01$, * indicates significance at $p<0.05$, ^{ns} indicates non-significance, SD represented the standard deviation of the phenotype, BB represented individuals homozygous for Basmati allele, BK represented individuals heterozygous for Basmati and KDML 105-9351(57D) alleles, and KK represented individuals homozygous for KDML 105-9351(57D) allele, $^{a, b, c}$ were ranked using the LSD test.

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ของประชากรเมล็ด F_5 เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยวิธี Pearson correlation พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2 GL7* และ *GS7* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) มีค่า r เท่ากับ 0.745 0.738 และ 0.725 ตามลำดับ แสดงว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2 GL7* และ GS7 กับความยาวเมล็ดมีระดับความสัมพันธ์สูงในเชิงบวก ในขณะเดียวกันจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวกับความกว้างเมล็ด มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) มีค่า r เท่ากับ -0.711 -0.711 และ -0.681 ตามลำดับ แสดงว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนดังกล่าวกับความกว้าง มีระดับความสัมพันธ์สูงในเชิงลบ นอกจากนี้ยังพบว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนดังกล่าวกับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) มีค่า r เท่ากับ -0.414 -0.403 และ -0.381 ตามลำดับ แสดงว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* และ *GL7* กับความหนามีระดับความสัมพันธ์ปานกลางในเชิงลบ และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GS7* กับความหนามีระดับความสัมพันธ์ต่ำในเชิงลบ (**Table 7**)

Table 7 Correlation coefficients (r) were calculated using Pearson correlation analysis of the 29 DNA markers located at or linked to the genes and their relationship with three grain size traits in the F_5 seed population

DNA markers of genes	Grain length		Grain width		Grain thickness	
	r	*P* value	r	*P* value	r	*P* value
GL7	0.745	0.000**	-0.711	0.000**	-0.414	0.000**
qGL7-2	0.738	0.000**	-0.711	0.000**	-0.403	0.000**
GS7	0.725	0.000**	-0.681	0.000**	-0.381	0.000**
TGW6	-0.209	0.014*	-0.181	0.034*	-0.363	0.000**
GW6a	-0.171	0.045*	-0.111	0.194ns	-0.273	0.001**
SMG1	0.369	0.000**	-0.117	0.170ns	-0.005	0.955ns
GS5	-0.195	0.022*	-0.040	0.645ns	-0.072	0.403ns
GW10	-0.164	0.055ns	-0.204	0.016*	-0.246	0.004**
GL4	-0.158	0.065ns	0.113	0.186ns	0.193	0.023*
qGL10	0.113	0.186ns	-0.003	0.973ns	0.171	0.045*
BG3	-0.110	0.198ns	-0.030	0.724ns	-0.135	0.116ns
OsBRI1	-0.037	0.670ns	-0.048	0.576ns	-0.107	0.213ns
FLR2	-0.078	0.364ns	-0.064	0.456ns	-0.156	0.068ns
GL1	-0.003	0.971ns	-0.010	0.912ns	-0.143	0.094ns
LG1	-0.011	0.897ns	0.063	0.461ns	-0.040	0.641ns
RGB1	-0.118	0.168ns	0.135	0.116ns	0.022	0.797ns
An-1	-0.038	0.660ns	0.047	0.586ns	0.015	0.865ns
qGL4b	-0.012	0.891ns	0.078	0.365ns	0.053	0.537ns
GW5	-0.086	0.314ns	-0.011	0.899ns	0.013	0.882ns
OsGSK2	0.049	0.571ns	-0.084	0.325ns	0.040	0.645ns
GW5.1	-0.050	0.560ns	0.077	0.371ns	0.036	0.674ns
OFP19	0.001	0.987ns	0.007	0.930ns	0.004	0.958ns
SMOS1	-0.040	0.641ns	0.073	0.395ns	0.021	0.809ns
GS6	-0.056	0.516ns	-0.081	0.344ns	-0.125	0.143ns
GLW7	0.137	0.108ns	-0.151	0.077ns	-0.058	0.497ns
qPE9	0.118	0.168ns	-0.092	0.283ns	0.048	0.578ns
GS9	-0.001	0.995ns	-0.025	0.771ns	0.014	0.869ns
qTGW9	-0.062	0.468ns	-0.097	0.260ns	-0.122	0.154ns
qGL12	0.076	0.377ns	0.050	0.563ns	0.152	0.075ns

** indicating significance at p<0.01, * indicates significance at p<0.05, ns indicates non-significance, and **r** represented correlation coefficient

นอกจากนี้ยังพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ *TGW6 GW6a GW10 SMG1 GS5 GL4* และ *qGL10* กับขนาดเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติที่ในระดับต่ำถึงต่ำมาก โดยจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ขณะที่กับความยาวและความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และมีระดับความสัมพันธ์ต่ำถึงต่ำมากในเชิงลบ ซึ่งมีค่า r เท่ากับ -0.363 -0.209 และ -0.181 ตามลำดับ ทำนองเดียวกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW6a* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ขณะที่กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และมีระดับความสัมพันธ์ต่ำถึงต่ำมากในเชิงลบ ซึ่งมีค่า r เท่ากับ -0.273 และ -0.171 ตามลำดับ เช่นเดียวกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW10* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ขณะที่กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และมีระดับความสัมพันธ์ต่ำในเชิงลบ ซึ่งมีค่า r เท่ากับ -0.246 และ -0.204 ตามลำดับ ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *SMG1* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) โดยมีระดับความสัมพันธ์ต่ำในเชิงบวก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 0.369 และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GS5* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีระดับความสัมพันธ์ต่ำมากในเชิงลบ ซึ่งมีค่า r เท่ากับ -0.195 นอกจากนี้ ยังพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL4* และ *qGL10* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีระดับความสัมพันธ์ต่ำมากในเชิงบวก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 0.193 และ 0.171 ตามลำดับ และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่เหลือไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดเมล็ดในประชากรเมล็ด F_5 (**Table 7**)

เมื่อวิเคราะห์ระดับความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 10 ตำแหน่ง ที่แสดงความสัมพันธ์กับขนาดเมล็ดข้างต้น ได้แก่ *SMG1 GL4 GS5 TGW6 GW6a qGL7-2 GL7 GS7 qGL10* และ *GW10* พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 3 ตำแหน่ง คือ *qGL7-2 GL7* และ *GS7* บนโครโมโซมที่ 7 มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) (**Table 8**)

Table 8 Correlation coefficients (r) were calculated using Pearson correlation analysis of the genotypes of 10 DNA markers located at or linked to the genes

DNA markers of genes	chr.	Gene position[1/] (bp)	*SMG1*	*GL4*	*GS5*	*TGW6*	*GW6a*	*qGL7-2*	*GL7*	*GS7*	*qGL10*	*GW10*
SMG1	2	33,442,070 – 33,443,948	1.000									
GL4	4	34,231,186 – 34,233,221	-0.161^{ns}	1.000								
GS5	5	3,439,304 – 3,443,769	-0.148^{ns}	0.074^{ns}	1.000							
TGW6	6	25,093,242 – 25,094,294	-0.012^{ns}	-0.012^{ns}	0.029^{ns}	1.000						
GW6a	6	26,591,905 – 26,593,464	0.060^{ns}	-0.020^{ns}	0.064^{ns}	0.843**	1.000					
qGL7-2	7	24,654,907 – 24,659,846	0.171*	-0.159^{ns}	-0.072^{ns}	0.004^{ns}	-0.048^{ns}	1.000				
GL7	7	24,664,328 – 24,669,321	0.178*	-0.172*	-0.089^{ns}	-0.008^{ns}	-0.061^{ns}	0.992**	1.000			
GS7	7	24,677,608 – 24,679,267	0.161^{ns}	-0.141^{ns}	-0.059^{ns}	-0.027^{ns}	-0.081^{ns}	0.960**	0.962**	1.000		
qGL10	10	13,467,597 – 13,469,366	-0.076^{ns}	0.240**	0.137^{ns}	0.044^{ns}	0.005^{ns}	0.058^{ns}	0.030^{ns}	0.060^{ns}	1.000	
GW10	10	19,863,346 – 19,865,997	0.034^{ns}	-0.117^{ns}	0.073^{ns}	0.153^{ns}	0.147^{ns}	0.027^{ns}	0.018^{ns}	0.022^{ns}	0.030^{ns}	1.000

[1/]Gene position from RAP-DB and GenBank database, ** indicating significance at p < 0.01, * indicates significance at p < 0.05, ^{ns} indicates non-significance, and Chr. stands for chromosome. Correlation coefficients are shown using Pearson analysis, which range from -1 to 1.

โดยพบว่า ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* และ *GL7* มีค่า r เท่ากับ 0.992 ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* และ *GS7* มีค่า r เท่ากับ 0.960 และระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* และ *GS7* มีค่า r เท่ากับ 0.962 แสดงว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายเอ็นเอของยีน 3 ตำแหน่ง มีระดับความสัมพันธ์กันสูงมากในเชิงบวก เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของยีนดังกล่าว พบว่า ยีน *qGL7-2* และ *GL7* อยู่ห่างกันเพียง 4,482 bp และยีน *GL7* และ *GS7* อยู่ห่างกันเพียง 8,287 bp เท่านั้น ซึ่งยีนทั้ง 3 ตำแหน่งอยู่ใกล้กันมาก นอกจากนี้ยังพบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6* และ *GW6a* บนโครโมโซมที่ 6 มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 0.843 แสดงว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6* และ *GW6a* มีระดับความสัมพันธ์กันสูงมากในเชิงบวก ซึ่งเมื่อตรวจสอบตำแหน่งของยีน *TGW6* และ *GW6a* พบว่ายีน 2 ตำแหน่งนี้ อยู่ห่างกัน 1,497,611 bp **(Table 8)**

การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายด้วยวิธี Simple regression ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ กับลักษณะความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด (ฟีโนไทป์) ของประชากรเมล็ด F_5 เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 7 ตำแหน่ง กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ โดยพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7* และ *SMG1* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนอีก 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *TGW6 GW6a* และ *GS5* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ซึ่งจากค่า a และ b ที่แสดงใน **Table 9** สามารถใช้ทำนายค่าฟีโนไทป์ คือ ความยาวเมล็ด ($\hat{y}$) ได้ดังนี้ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* มีค่า a เท่ากับ 7.540 และค่า b เท่ากับ 0.506 ได้สมการทำนาย $\hat{y}$ = 7.540 + 0.506 *GL7* แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* ได้อัลลีลจากพ่อ (Basmati) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้ความยาวเมล็ด ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้น 0.506 มม. และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* สามารถอธิบายความผันแปรของความยาวเมล็ด (R^2) ได้ 55.51% (**Table 9**) ทำนองเดียวกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2, GS7* และ *SMG1* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 0.493, 0.512 และ 0.254 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้อัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้ความยาวเมล็ด ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เนื่องจาก b มีค่าเป็นบวก และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2 GS7* และ *SMG1* สามารถอธิบายความผันแปรของความยาวเมล็ด (R^2) ได้ 54.50 52.61 และ 13.59% ตามลำดับ (**Table 9**)

ในทางตรงกันข้าม จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6* มีค่า a เท่ากับ 8.102 และค่า b เท่ากับ -0.142 ได้สมการทำนาย $\hat{y}$ = 8.102 - 0.142 *TGW6* แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6* ได้อัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้ความยาวเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.142 มม. และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6* สามารถอธิบายความผันแปรของความยาวเมล็ด (R^2) ได้ 4.37% (**Table 9**) ทำนองเดียวกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW6a* และ *GS5* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -0.120 และ -0.135 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้อัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้ความยาวเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลงเช่นเดียวกัน เนื่องจาก b มีค่าเป็นลบ และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW6a* และ *GS5* สามารถอธิบายความผันแปรของความยาวเมล็ด (R^2) ได้ 2.93 และ 3.79% ตามลำดับ (**Table 9**) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหลือ 22 ตำแหน่ง กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ผลการศึกษาในลักษณะความกว้างเมล็ด พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 5 ตำแหน่ง กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ โดยพบ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2* และ *GS7* กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนอีก 2 ตำแหน่ง ได้แก่ *TGW6* และ *GW10* กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* มีค่า a เท่ากับ 2.077 และค่า b เท่ากับ -0.106 ได้สมการทำนาย $\hat{y}$ = 2.077 – 0.106 *qGL7-2* แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* ได้อัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้ความกว้างเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.106 มม. และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* สามารถอธิบายความผันแปรของความกว้างเมล็ด (R^2) ได้ 50.62% (**Table 9**)

Table 9 Simple regression analysis of the 29 DNA markers located at or linked to the genes and their relationship with three grain size traits in the F_5 seed population

DNA markers	Grain length					Grain width					Grain thickness				
of genes	***a***	***b***	SE	R^2 (%)	*P* value	***a***	***b***	SE	R^2 (%)	*P* value	***a***	***b***	SE	R^2 (%)	*P* value
GL7	7.540	0.506	0.039	55.51	0.000^{**}	2.076	-0.107	0.009	50.54	0.000^{**}	1.656	-0.027	0.005	17.13	0.000^{**}
qGL7-2	7.539	0.493	0.039	54.50	0.000^{**}	2.077	-0.106	0.009	50.62	0.000^{**}	1.656	-0.026	0.005	16.27	0.000^{**}
GS7	7.542	0.512	0.042	52.61	0.000^{**}	2.074	-0.107	0.010	46.31	0.000^{**}	1.655	-0.026	0.005	14.52	0.000^{**}
TGW6	8.102	-0.142	0.057	4.37	0.014^{*}	2.018	-0.027	0.013	3.26	0.034^{*}	1.660	-0.024	0.005	13.17	0.000^{**}
GW6a	8.084	-0.120	0.059	2.93	0.045^{*}	2.008	-0.017	0.013	1.24	0.194^{ns}	1.655	-0.019	0.006	7.44	0.001^{**}
SMG1	7.652	0.254	0.055	13.59	0.000^{**}	2.010	-0.018	0.013	1.38	0.170^{ns}	1.634	0.000	0.006	0.00	0.955^{ns}
GS5	8.074	-0.135	0.058	3.79	0.022^{*}	1.994	-0.006	0.013	0.16	0.645^{ns}	1.639	-0.005	0.006	0.51	0.403^{ns}
GW10	8.061	-0.118	0.061	2.68	0.055^{ns}	2.020	-0.033	0.013	4.16	0.017^{*}	1.650	-0.017	0.006	6.06	0.004^{**}
GL4	8.043	-0.107	0.057	2.45	0.065^{ns}	1.974	0.017	0.013	1.28	0.186^{ns}	1.623	0.013	0.006	3.73	0.023^{*}
qGL10	7.890	0.087	0.065	1.28	0.186^{ns}	1.989	-0.001	0.015	0.00	0.973^{ns}	1.625	0.013	0.006	2.92	0.045^{*}
BG3	8.039	-0.079	0.061	1.22	0.198^{ns}	1.994	-0.005	0.014	0.09	0.724^{ns}	1.645	-0.009	0.006	1.81	0.116^{ns}
OsBRI1	7.980	-0.025	0.058	0.13	0.670^{ns}	1.997	-0.007	0.013	0.23	0.576^{ns}	1.643	-0.007	0.006	1.14	0.213^{ns}
FLR2	8.016	-0.055	0.060	0.61	0.365^{ns}	2.001	-0.010	0.013	0.41	0.456^{ns}	1.647	-0.011	0.006	2.42	0.068^{ns}
GL1	7.952	-0.002	0.057	0.00	0.971^{ns}	1.990	-0.001	0.013	0.06	0.912^{ns}	1.644	-0.009	0.006	2.05	0.094^{ns}
LG1	7.956	-0.007	0.058	0.01	0.897^{ns}	1.990	-0.001	0.013	0.40	0.461^{ns}	1.636	-0.003	0.006	0.16	0.641^{ns}
RGB1	8.030	-0.083	0.060	1.39	0.168^{ns}	1.968	0.021	0.013	1.81	0.116^{ns}	1.633	0.002	0.006	0.05	0.797^{ns}
An-1	7.972	-0.029	0.066	0.14	0.660^{ns}	1.983	0.008	0.015	0.22	0.586^{ns}	1.633	0.001	0.006	0.02	0.865^{ns}
qGL4b	7.956	-0.008	0.060	0.01	0.891^{ns}	1.980	0.012	0.013	0.60	0.365^{ns}	1.631	0.004	0.006	0.28	0.537^{ns}
GW5	8.013	-0.060	0.059	0.75	0.314^{ns}	1.990	-0.002	0.013	0.01	0.899^{ns}	1.633	0.001	0.006	0.02	0.882^{ns}
OsGSK2	7.916	0.033	0.058	0.24	0.571^{ns}	2.002	-0.013	0.013	0.71	0.325^{ns}	1.631	0.003	0.006	0.16	0.645^{ns}
GW5.1	7.985	-0.034	0.059	0.25	0.560^{ns}	1.977	0.012	0.013	0.59	0.371^{ns}	1.632	0.002	0.006	0.13	0.674^{ns}
OFP19	7.949	0.001	0.057	0.00	0.987^{ns}	1.987	0.001	0.013	0.01	0.930^{ns}	1.634	0.000	0.006	0.00	0.958^{ns}
SMOS1	7.980	-0.029	0.063	0.16	0.641^{ns}	1.976	0.012	0.014	0.53	0.395^{ns}	1.633	0.001	0.006	0.04	0.809^{ns}
GS6	8.000	-0.040	0.061	0.31	0.516^{ns}	2.005	-0.013	0.014	0.01	0.344^{ns}	1.645	-0.009	0.006	1.57	0.143^{ns}
GLW7	7.876	0.096	0.059	1.88	0.108^{ns}	2.007	-0.023	0.013	2.27	0.077^{ns}	1.637	-0.004	0.006	0.34	0.497^{ns}
qPE9	7.871	0.088	0.064	1.39	0.168^{ns}	2.002	-0.015	0.014	0.85	0.283^{ns}	1.631	0.003	0.006	0.23	0.578^{ns}
GS9	7.950	0.000	0.057	0.00	0.995^{ns}	1.992	-0.004	0.013	0.06	0.771^{ns}	1.633	0.001	0.006	0.02	0.869^{ns}
qTGW9	7.987	-0.046	0.063	0.39	0.468^{ns}	2.002	-0.016	0.014	0.93	0.260^{ns}	1.641	-0.009	0.006	1.49	0.154^{ns}
qGL12	7.886	0.056	0.063	0.57	0.377^{ns}	1.979	0.008	0.014	0.25	0.563^{ns}	1.622	0.011	0.006	2.31	0.075^{ns}

** indicating significance at p<0.01, * indicates significance at p<0.05, ^{ns} indicates non-significance, $\hat{y}$ represented the predicted phenotype (including grain length, grain width, and grain thickness), $\boldsymbol{x}$ represented the genotype of DNA markers, $\boldsymbol{a}$ represented the constant term, $\boldsymbol{b}$ represented the regression coefficient, **SE** represented Standard Error, and R^2 represented the coefficient of determination.

ทำนองเดียวกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7 GS7 GW10* และ *TGW6* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -0.107 -0.107 -0.033 และ -0.027 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้อัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้ความกว้างเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลงเช่นเดียวกัน เนื่องจาก b มีค่าเป็นลบ และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7 GS7 GW10* และ *TGW6* สามารถอธิบายความผันแปรของความกว้างเมล็ด (R^2) ได้ 50.54 46.31 4.16 และ 3.26% ตามลำดับ (**Table 9**) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหลือ 24 ตำแหน่ง กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ผลการศึกษาในลักษณะความหนาเมล็ด พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 8 ตำแหน่ง กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ โดยพบ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 TGW6 GW6a* และ *GW10* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนอีก 2 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL4* และ *qGL10* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* มีค่า a เท่ากับ 1.656 และค่า b เท่ากับ -0.027 ได้สมการทำนาย $\hat{y}$ = 1.656 – 0.027 *GL7* แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* ได้อัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้ความหนาเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.027 มม. และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* สามารถอธิบายความผันแปรของความหนาเมล็ด (R^2) ได้ 17.13% (**Table 9**) ทำนองเดียวกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2 GS7 TGW6 GW6a* และ *GW10* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -0.026 -0.026 -0.024 -0.019 และ -0.017 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้อัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้ความหนาเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลงเช่นเดียวกัน เนื่องจาก b มีค่าเป็นลบ และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2 GS7 TGW6 GW6a* และ *GW10* สามารถอธิบายความผันแปรของความหนาเมล็ด (R^2) ได้ 16.27 14.52 13.17 7.44 และ 6.06% ตามลำดับ (**Table 9**) ในทางตรงกันข้าม จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL4* และ *qGL10* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 0.013 และ 0.013 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้อัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้ความหนาเมล็ด ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้น 0.013 และ 0.013 ตามลำดับ เนื่องจาก b มีค่าเป็นบวก และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL4* และ *qGL10* สามารถอธิบายความผันแปรของความหนาเมล็ด (R^2) ได้ 3.73 และ 2.92% ตามลำดับ (**Table 9**) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหลือ 21 ตำแหน่ง กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

จากผลการศึกษาถดถอยอย่างง่ายระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 29 ตำแหน่ง กับขนาดเมล็ดของประชากรเมล็ด F_5 ข้างต้นพบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 SMG1 TGW6 GW6a* และ *GS5* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ขณะที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 TGW6* และ *GW10* กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 8 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 TGW6 GW6a GW10 GL4* และ *qGL10* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้มาวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณด้วยวิธี Multiple regression เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง กับทั้ง 3 ลักษณะ จากผลการวิเคราะห์หาทิศทางและระดับความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอข้างต้น พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7 qGL7-2* และ *GS7* บนโครโมโซมที่ 7 มีความสัมพันธ์กันสูง เช่นเดียวกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6* และ *GW6a* บนโครโมโซมที่ 6 ซึ่งมีค่า r มากกว่า 0.80 (**Table 8**) เพื่อไม่ให้เกิดปัญหา multicollinearity เกิดขึ้นเมื่อตัวแปรอิสระหลายตัวมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ค่อนข้างสูง ซึ่งส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจและค่าประมาณการกำลังสองน้อยที่สุด (R^2) มีค่าสูง อาจแปรค่าได้ว่าตัวแปรอิสระไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ ซึ่งอาจทำให้การตัดสินใจผิดพลาดได้ จึงใช้การเลือกตัวแปรโดยวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบลำดับขั้น (stepwise regression)

การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของรูปแบบที่ดีที่สุด เมื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 SMG1 TGW6 GW6a* และ *GS5* กับลักษณะความยาวเมล็ด ผลปรากฏว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 3 ตำแหน่ง คือ *GL7 SMG1* และ *TGW6* มีผลต่อความยาวเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และสามารถร่วมกันอธิบายความผันแปรของความยาวเมล็ดได้ 64.15% โดยที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* มีผลต่อความยาวเมล็ดมากที่สุด ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 0.475 รองลงมา คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *SMG1* และ *TGW6* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 0.162 และ -0.135 ตามลำดับ ได้สมการทำนาย $\hat{y}$ = 7.519 + 0.475 *GL7*(x_1) + 0.162 *SMG1*(x_2) - 0.135 *TGW6*(x_3)

แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 ตำแหน่ง เหมือนแม่ (KDML 105-9351(57D)) คือ KK, KK และ KK ความยาวเมล็ด ($\hat{y}$) เท่ากับ 7.519 มม. เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *SMG1*(x_2) และ *TGW6*(x_3) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อ (Basmati) ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7*(x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความยาวเมล็ด ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้น 0.475 มม. ในทำนองเดียวกัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7*(x_1) และ *TGW6*(x_3) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *SMG1*(x_2) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความยาวเมล็ด ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้น 0.162 มม. แต่เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7*(x_1) และ *SMG1*(x_2) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6*(x_3) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความยาวเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.135 มม. (**Table 10**) ดังนั้น ถ้าต้องการเพิ่มความยาวเมล็ดต้องคัดเลือกยีน *GL7* และ *SMG1* ให้มีอัลลีลเหมือนพ่อ คือ Basmati และคัดเลือกยีน *TGW6* ให้มีอัลลีลเหมือนแม่ คือ KDML 105-9351(57D)

Table 10 Multiple regression analysis of the DNA markers located at or linked to the genes and their relationship with three grain size traits in the F_5 seed population

Traits	DNA markers of genes (x)	Regression models $\hat{y} = b_0+b_1x_1+b_2x_2+…+b_kx_k$	SE	Adjusted R^2	*P* value
Grain length	*GL7*(x_1) *SMG1*(x_2) *TGW6*(x_3)	$\hat{y}$ = 7.519 + 0.475 *GL7*(x_1) + 0.162 *SMG1*(x_2) - 0.135 *TGW6*(x_3)	0.068	0.6415	0.000**
Grain width	*qGL7-2*(x_4) *GW10*(x_5) *TGW6*(x_3)	$\hat{y}$ = 2.126 - 0.105 *qGL7-2*(x_4) - 0.026 *GW10*(x_5) - 0.023 *TGW6*(x_3)	0.016	0.5539	0.000**
Grain thickness	*GL7*(x_1) *TGW6*(x_3) *qGL10*(x_6) *GW10*(x_5)	$\hat{y}$ = 1.684 - 0.028 *GL7*(x_1) - 0.023 *TGW6*(x_3) + 0.016 *qGL10*(x_6) - 0.014 *GW10*(x_5)	0.009	0.3660	0.000**

** indicating significance at *p*<0.01, $\hat{y}$ represented the predicted phenotype (including grain length, grain width, and grain thickness), b_0 represented the constant term, b represented the regression coefficient, x_1 represented the genotype of the DNA marker of the *GL7* gene, x_2 represented the genotype of the DNA marker of the *SMG1* gene, x_3 represented the genotype of the DNA marker of the *TGW6* gene, x_4 represented the genotype of the DNA marker of the *qGL7-2* gene, x_5 represented the genotype of the DNA marker of the *GW10* gene, x_6 represented the genotype of the DNA marker of the *qGL10* gene, **SE** represented Standard Error, and R^2 represented the coefficient of determination.

เมื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 TGW6* และ *GW10* กับลักษณะความกว้างเมล็ด ผลปรากฏว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 3 ตำแหน่ง คือ *qGL7-2 GW10* และ *TGW6* มีผลต่อความกว้างเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (*p*<0.01) และสามารถร่วมกันอธิบายความผันแปรของความกว้างเมล็ดได้ 55.39% โดยที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* มีผลต่อความกว้างเมล็ดมากที่สุด ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -0.105 รองลงมา คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW10* และ *TGW6* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -0.026 และ -0.023 ตามลำดับ ได้สมการทำนาย $\hat{y}$ = 2.126 - 0.105 *qGL7-2*(x_4) - 0.026 *GW10*(x_5) - 0.023 *TGW6*(x_3) แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 ตำแหน่ง เหมือนแม่ คือ KK KK และ KK ความกว้างเมล็ด ($\hat{y}$) เท่ากับ 2.126 มม. เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2*(x_4) และ *GW10*(x_5) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6*(x_3) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความกว้างเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.023 มม. ในทำนองเดียวกัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2*(x_4) และ *TGW6*(x_3) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW10*(x_5) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความกว้างเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.026 มม. หรือเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์

ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW10*(x_5) และ *TGW6*(x_3) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2*(x_4) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความกว้างเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.105 มม. (**Table 10**) ดังนั้น ถ้าต้องการเพิ่มความกว้างเมล็ดต้องคัดเลือกยีนทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ *qGL7-2, GW10* และ *TGW6* ให้มีอัลลีลเหมือนแม่ คือ KDML 105-9351(57D)

เมื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 8 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 TGW6 GW6a GW10 GL4* และ *qGL10* กับลักษณะความหนาเมล็ด ผลปรากฏว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 4 ตำแหน่ง คือ *GL7 TGW6 qGL10* และ *GW10* มีผลต่อความหนาเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และสามารถร่วมกันอธิบายความผันแปรของความหนาเมล็ดได้ 36.60% โดยที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* มีผลต่อความหนาเมล็ดมากที่สุด ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -0.028 รองลงมา คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6, qGL10* และ *GW10* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -0.023 +0.016 และ -0.014 ตามลำดับ ได้สมการทำนาย $\hat{y}$ = 1.684 - 0.028 *GL7*(x_1) - 0.023 *TGW6*(x_3) + 0.016 *qGL10*(x_6) - 0.014 *GW10*(x_5) แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 4 ตำแหน่ง เหมือนแม่ คือ KK KK KK และ KK ความหนาเมล็ด ($\hat{y}$) เท่ากับ 1.684 มม. เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7*(x_1) *TGW6*(x_3) และ *GW10*(x_5) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL10*(x_6) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความหนาเมล็ด ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้น 0.016 มม. แต่เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7*(x_1) *TGW6*(x_3) และ *qGL10*(x_6) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW10*(x_5) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความหนาเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.014 มม. ในทำนองเดียวกัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7*(x_1), *qGL10*(x_6) และ *GW10*(x_5) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6*(x_3) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความหนาเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.023 มม. หรือ เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6*(x_3), *qGL10*(x_6) และ *GW10*(x_5) คงที่ และมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7*(x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ความหนาเมล็ด ($\hat{y}$) ลดลง 0.028 มม. (**Table 10**) ดังนั้น ถ้าต้องการเพิ่มความหนาเมล็ดต้องคัดเลือกยีน *qGL10* ให้มีอัลลีลเหมือนพ่อ คือ Basmati และคัดเลือกยีน *GL7 TGW6* และ *GW10* ให้มีอัลลีลเหมือนแม่ คือ KDML 105-9351(57D)

วิจารณ์

ขนาดเมล็ดเป็นลักษณะสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพข้าว ขนาดเมล็ดถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง จากงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดจำนวน 29 ตำแหน่ง กับฟีโนไทป์ คือ ลักษณะความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด ของประชากรเมล็ด F_5 ที่เกิดจากพันธุ์แม่ คือ KDML 105-9351(57D) กับพันธุ์พ่อ คือ Basmati เนื่องจากในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ใช้ประชากรเมล็ด F_5 ซึ่งมีอัตราความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) ประมาณ 93.75% โดยยีนจะเริ่มเข้าสู่สภาพ homozygous ซึ่งใกล้เคียงกับสายพันธุ์ RILs (recombinant inbred lines) มีอัตราความคงตัวทางพันธุกรรมมากกว่า 98% ซึ่งปัจจุบันสายพันธุ์ RILs ถูกนำมาศึกษาการหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะเชิงปริมาณในพืชผสมตัวเองมากที่สุด เนื่องจากเป็นประชากรที่สามารถทำซ้ำหรือขยายเพิ่มปริมาณประชากรได้ (ธานี, 2566; สุรีพร, 2566) จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดจำนวน 6 ตำแหน่ง คือ *GL7 SMG1 TGW6 qGL7-2 GW10* และ *qGL10* มีความสัมพันธ์กับขนาดเมล็ดข้าว **(Table 10)** ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการใช้ Multiple regression เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นหลายตัวพร้อมกัน อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ความซับซ้อนของความสัมพันธ์หรือผลกระทบข้ามตัวแปร (epistatic effects) ที่เกิดขึ้นระหว่างตัวแปรต้นได้มากกว่า Simple regression หรือ Simple interval mapping (SIM) ที่ใช้วิเคราะห์กับแต่ละตัวแปรต้นแยกต่างหาก จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเมล็ด แต่กลับมีความสัมพันธ์เชิงลบกับความหนาเมล็ด เครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel1 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภท functional nucleotide polymorphisms (FNPs) ที่จำเพาะกับยีน *GL7* (*Os07g0603300*) ซึ่งได้มาจากงานวิจัยของ Zhang et al. (2020) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel 1 มีความจำเพาะกับ 11 bp indel ในตำแหน่ง -104 บริเวณ 5'UTR ของยีน *GL7* และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้าวเมล็ดยาว เช่น Lemont Katy และ Della กับกลุ่มข้าวเมล็ดสั้น

Chau Zhenshan 97B และ Chuan 4 ได้ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 5'UTR ของยีน *GL7* ในข้าวเมล็ดยาวดังกล่าวและข้าวพันธุ์พ่อ Basmati พบการขาดหายของ 11 bp ในตำแหน่ง -104 และมีการเพิ่มขึ้นของ 17 bp ในตำแหน่ง -145 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของทั้ง 2 ตำแหน่งนี้ในกลุ่มข้าวเมล็ดสั้นดังกล่าวและข้าวพันธุ์แม่ KDML 105-9351(57D) Wang et al. (2015a) รายงานว่าในข้าวเมล็ดยาว *indica* สายพันธุ์ NIL-GW7^{TFA} มีรูปร่างเมล็ดเรียวยาวเนื่องจากมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นในทิศทางตามยาว ขณะเดียวกันมีการแบ่งเซลล์ลดลงในทิศทางตามขวาง ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงบริเวณ 5'UTR ในตำแหน่ง -104 และ -145 ของยีน *GW7* (*LOC_Os07g41200/Os07g0603300*) และไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในข้าวเมล็ดสั้น *indica* พันธุ์ Zhenshan 97A, 93-11 และ Minghui86 ซึ่งสอดคล้องกับที่พบในงานวิจัยนี้ จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเมล็ด แต่กลับมีความสัมพันธ์เชิงลบกับความหนาเมล็ด ดังนั้นถ้าคัดเลือกให้ยีนตำแหน่งนี้เป็น homozygous ของอัลลีล Basmati จะทำให้ความยาวเมล็ดเพิ่มขึ้น 0.950 มม. (***b*** = 0.475) แต่ก็ต้องตระหนักว่าความหนาของเมล็ดจะลดลง 0.056 มม. (***b*** = -0.028) ด้วย ดังนั้นอาจจะต้องเพิ่มยีนในตำแหน่งอื่นที่มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อความหนาเมล็ดเข้ามาด้วยเพื่อชดเชยความหนาของเมล็ดที่ลดลงไป

ในงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *SMG1* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเมล็ด แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับความกว้างและความหนาเมล็ด และเมื่อเทียบลำดับเบสภายในยีน *SMG1* (*Os02g0787300*) ของพันธุ์แม่ KDML 105-9351(57D) กับพันธุ์พ่อ Basmati พบความแตกต่างแบบ nonsynonymous ใน exon 1 ตำแหน่ง cDNA ที่ 41 โดย KDML 105-9351(57D) มีเบสเป็น A มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน Glutamine ส่วนใน Basmati มีเบสเป็น T และแปลรหัสเป็นโปรตีน Leucine ซึ่งจากการศึกษาของ Duan et al. (2014) รายงานว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโคดอนที่ 135 จาก <u>G</u>TC ไปเป็น <u>A</u>TC ในสายพันธุ์ข้าวเมล็ดเล็ก *smg1-1* ซึ่งต่างจากข้าวเมล็ดยาว SF43 และพบการเพิ่มขึ้นของเบส GG ในตำแหน่งเบสที่ 376 จาก start codon ของสายพันธุ์ข้าวเมล็ดเล็ก *smg1-2* ซึ่งต่างจาก Nipponbare โดยยีน *smg1* ที่กลายพันธุ์นี้ส่งผลให้การทำงานเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนเซลล์บกพร่องจึงทำให้ข้าวมีขนาดเมล็ดเล็ก จากลำดับเบสของพันธุ์แม่ KDML 105-9351(57D) และพันธุ์พ่อ Basmati ในตำแหน่งโคดอนที่ 135 มีเบสเป็น <u>G</u>TC ซึ่งเหมือนกับข้าวเมล็ดยาว SF43 และในตำแหน่งเบสที่ 376 ข้าวทั้งสองพันธุ์มีเบสเป็น GG ซึ่งเหมือนกับ Nipponbare จึงยังไม่แน่ชัดว่าการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งใดของยีน *SMG1* ที่ไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดเมล็ดในประชากรจากงานวิจัยนี้ จึงต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต แต่เนื่องจากผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติพบว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *SMG1* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเมล็ด ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ของประชากรที่เกิดจากคู่ผสมในงานวิจัยนี้ ถ้าคัดให้ยีน *SMG1* เป็น homozygous ของอัลลีล Basmati จะทำให้ความยาวเมล็ดเพิ่มขึ้น 0.324 มม. (***b*** = 0.162) และไม่มีผลกระทบต่อความกว้างและความหนาของเมล็ด

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับทั้งความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *TGW6* (*Os06g0623700*) ระหว่างพันธุ์แม่ KDML 105-9351(57D) และพันธุ์พ่อ Basmati พบบริเวณ exon 1 ตำแหน่งเบสที่ 546 650 และ 690 ใน KDML 105-9351(57D) มีเบสเป็น T G และ T ตามลำดับ ขณะที่ Basmati มีเบสเป็น C T และ G ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับ Ishimaru et al. (2013) ที่รายงานว่าในตำแหน่งดังกล่าวของพันธุ์ Kasalath มีเบสเป็น T G และ T โดยเป็นอัลลีล *tgw6* ที่กลายพันธุ์และเหมือนกับที่พบใน KDML 105-9351(57D) ส่วนในพันธุ์ Nipponbare มีเบสเป็น C T และ G โดยเป็นอัลลีล *TGW6* ที่ทำงานปกติและเหมือนกับที่พบใน Basmati โดยยีน *tgw6* ที่กลายพันธุ์นี้มีผลต่อการเพิ่มความยาวและความกว้างของเมล็ด ซึ่งเป็นผลมาจากการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นรวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นในระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว โดยอัลลีล *TGW6* ที่ทำงานได้จะสร้าง IAA อิสระออกมาจึงไปยับยั้งการแบ่งเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ส่งผลให้ข้าวมีขนาดเล็ก ขณะที่อัลลีล *tgw6* ที่กลายพันธุ์จะไม่สร้าง IAA อิสระออกมาจึงทำให้การแบ่งเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ไม่ถูกยับยั้งส่งผลให้ข้าวมีขนาดเมล็ดยาวขึ้น (Ishimaru et al., 2013) ในงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *TGW6* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับทั้งความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด ถ้าคัดให้ยีนตำแหน่งนี้เป็น homozygous ของอัลลีล Basmati

จะทำให้ความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ดลดลง 0.27 0.046 และ 0.046 มม. ตามลำดับ (***b*** = -0.135 -0.023 และ -0.023 ตามลำดับ) ดังนั้นต้องคัดเลือกให้ยีน *TGW6* เป็น homozygous ของอัลลีล KDML 105-9351(57D) จึงไม่ทำให้ขนาดเมล็ดลดลง

จากผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Simple regression พบว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเมล็ด มีค่า R^2 เท่ากับ 54.50% แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความกว้างและความหนาเมล็ด มีค่า R^2 เท่ากับ 50.62 และ 16.27% ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Multiple regression พบว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความกว้างเมล็ด และไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวและความหนาเมล็ด โดยที่เครื่องหมายดีเอ็นเอ Indel1 ที่ใช้สำหรับยีน *qGL7-2* ได้มาจากงานวิจัยของ Shao et al. (2010) ซึ่งรายงานว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Simple regression พบความสัมพันธ์กับความยาวเมล็ดในประชากร F_2 และ $F_{2:3}$ ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวเมล็ดสั้น HB277 (*indica*) และข้าวเมล็ดยาว D50 (*javanica*) ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 53.13 และ 73.34% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณเครื่องหมายดีเอ็นเอ Indel1 ของ KDML 105-9351(57D) กับข้าวเมล็ดสั้น HB277 พบว่าเหมือนกัน และลำดับเบสในบริเวณดังกล่าวของ Basmati เหมือนกับข้าวเมล็ดยาว D50 นอกจากนี้ Shao et al. (2010) รายงานว่าลำดับเบสในบริเวณดังกล่าวของข้าวเมล็ดยาวพันธุ์ Lemont เหมือนกับของข้าวเมล็ดยาวพันธุ์ D50 จากงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความกว้างเมล็ด ดังนั้นถ้าคัดเลือกให้ยีนตำแหน่งนี้เป็น homozygous ของอัลลีล Basmati จะทำให้ความกว้างลดลง 0.210 มม. (***b*** = -0.105) จึงต้องคัดเลือกให้ยีน *qGL7-2* เป็น homozygous ของอัลลีล KDML 105-9351(57D) จึงไม่ทำให้ความกว้างเมล็ดลดลง

ในงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW10* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับทั้งความกว้างและความหนาเมล็ด แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับความยาว และพบว่าบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *GW10* (*Os10g0515400*) ของพันธุ์แม่ KDML 105-9351(57D) และพันธุ์พ่อ Basmati มีลำดับเบสแตกต่างกันหลายตำแหน่ง จากรายงานของ Zhan et al. (2021) ที่พบว่าบริเวณโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง -049 -879 และ -1,227 ของยีน *GW10* ในสายพันธุ์ข้าวเมล็ดเล็ก NIL-*gw10* มีเบสเป็น C deletion T และ A ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ข้าวเมล็ดใหญ่ NIL-*GW10* (HJX74) มีเบสเป็น T T และ G ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการขาดหาย 3.3 kb ที่ตำแหน่ง -2,281 ในสายพันธุ์ข้าวเมล็ดเล็ก NIL-*gw10* แต่ไม่พบการขาดหายนี้ในสายพันธุ์ข้าวเมล็ดใหญ่ NIL-*GW10* (HJX74) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งดังกล่าวส่งผลให้สายพันธุ์ NIL-*gw10* มีเมล็ดขนาดเล็ก โดยยีน *GW10* มีบทบาทเชิงบวกในการควบคุมขนาดและจำนวนเมล็ดผ่านวิถี BR ซึ่งความหลากหลายของลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน *GW10* เมื่อมีการแสดงออกสูงจะส่งผลให้เมล็ดข้าวมีขนาดยาวและกว้างขึ้น ขณะที่ถ้ามีการแสดงออกที่ต่ำจะส่งผลให้เมล็ดข้าวมีขนาดสั้นและแคบลง (Zhan et al., 2021) จากงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GW10* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับทั้งความกว้างและความหนาเมล็ด ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวประชากรของงานวิจัยนี้ ถ้าคัดให้ยีนตำแหน่งนี้เป็น homozygous ของอัลลีล Basmati จะทำให้ความกว้าง และความหนาเมล็ดลดลง 0.052 และ 0.028 มม. ตามลำดับ (***b*** = -0.026 และ -0.014 ตามลำดับ) ดังนั้นจะต้องคัดเลือกให้ยีน *GW10* เป็น homozygous ของอัลลีล KDML 105-9351(57D) จึงไม่ทำให้ความกว้างและความหนาเมล็ดลดลง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression ของงานวิจัยนี้พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL10* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความหนาเมล็ด แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวและความกว้างเมล็ด เมื่อเปรียบเทียบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *qGL10 (Os10g0400100)* ของพันธุ์แม่ KDML 105-9351(57D) กับพันธุ์พ่อ Basmati พบมีลำดับเบสแตกต่างกันหลายตำแหน่ง จากการศึกษาของ Chen et al. (2023) ได้เปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *qGL10/OsMADS56* (*Os10g0400100*) ของพันธุ์ 02428 (ข้าวเมล็ดสั้น *japonica*) และสายพันธุ์ LB3 ซึ่งเป็น NIL ที่เกิดจาก 02428 x Zhai-Ye-Xi (Zhai-Ye-Xi ใช้เป็นพันธุ์ให้ความยาวเมล็ด) พบว่าลำดับเบสของสายพันธุ์ LB3 มี SNPs จำนวน 15 ตำแหน่งในบริเวณโปรโมเตอร์หรือประมาณ 2 kb จาก start codon และพบว่า SNP ตำแหน่งที่ 9 มีการเปลี่ยนแปลงจากเบส G เป็น A ซึ่งส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีน *OsMADS56* ที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้ความยาวเมล็ดเพิ่มขึ้นในสายพันธุ์ LB3 โดยยีน *qGL10/OsMADS56* กำหนดรหัสของโปรตีน MIKC-type MADS-box ควบคุมความยาวเมล็ดโดยไม่กระทบต่อความกว้าง โดยเกี่ยวข้องกับการควบคุมการพัฒนาเซลล์ของเปลือก

เมล็ดตามยาวโดยไม่ส่งผลต่อการพัฒนาเซลล์ตามขวางและไปมีผลทำให้น้ำหนัก 1,000 เมล็ดเพิ่มขึ้น (Chen et al., 2023) จากงานวิจัยนี้วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL10* ความสัมพันธ์เชิงบวกกับความหนาเมล็ด ถ้าคัดเลือกให้ยีนตำแหน่งนี้เป็น homozygous ของอัลลีล Basmati จะทำให้ความหนาเมล็ดเพิ่มขึ้น 0.032 มม. ($\boldsymbol{b}$ = 0.016) และไม่มีผลกระทบต่อความยาวและความกว้างของเมล็ด

จาก Regression models **(Table 10)** สามารถทำนายความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ดของประชากรที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง KDML 105-9351(57D) กับ Basmati นี้ โดยถ้ากำหนดให้ยีนทั้ง 6 ตำแหน่งมีจีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีล KDML 105-9351(57D) ทั้งหมด คือ $GL7^{KK}SMG1^{KK}TGW6^{KK}qGL7\text{-}2^{KK}GW10^{KK}qGL10^{KK}$ สามารถทำนายความยาวเมล็ดได้เท่ากับ 7.519 + (0.475x0(*GL7*)) + (0.162x0(*SMG1*)) – (0.135x0(*TGW6*)) + (0x0(*qGL7-2*)) + (0x0(*GW10*)) + (0x0(*qGL10*)) = 7.519 มม. ความกว้างเท่ากับ 2.126 มม. และความหนาเท่ากับ 1.684 มม. ถ้ากำหนดให้ยีนทั้ง 6 ตำแหน่งมีจีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลของ Basmati ทั้งหมด คือ $GL7^{BB}SMG1^{BB}TGW6^{BB}qGL7\text{-}2^{BB}GW10^{BB}qGL10^{BB}$ สามารถทำนายความยาวเมล็ดได้เท่ากับ 8.523 มม. ความกว้างเท่ากับ 1.818 มม. และความหนาเท่ากับ 1.586 มม. จากการทำนายข้างต้นจะกำหนดให้ข้าวที่มียีนทั้ง 6 ตำแหน่งที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีล KDML 105-9351(57D) ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน ถ้าต้องการเพิ่มทั้งความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ดจะต้องเลือกอัลลีลให้เหมาะสมกับยีนแต่ละตำแหน่ง เช่น ถ้าคัดเลือกให้มีจีโนไทป์เป็น $GL7^{BB}SMG1^{BB}TGW6^{KK}qGL7\text{-}2^{KK}GW10^{KK}qGL10^{BB}$ จะทำให้ทำนายความยาวเมล็ดได้เท่ากับ 8.793 มม. ซึ่งความยาวจะเพิ่มขึ้นจากตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน เท่ากับ 8.793-7.519/7.519x100 = 16.944% ทำนายความกว้างเมล็ดได้เท่ากับ 2.126 มม. ซึ่งความกว้างจะไม่เปลี่ยนแปลงจากตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน คือ มีค่าเท่ากับ 2.126-2.126/2.126x100 = 0% และทำนายความหนาเมล็ดได้เท่ากับ 1.660 มม. ซึ่งความหนาลดลงจากตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน เท่ากับ 1.660-1.684/1.684x100 = -1.425% และทำให้ขนาดเมล็ดเพิ่มขึ้นรวมจากตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน เท่ากับ 16.944+0–1.425 = 15.519% ถึงแม้รูปแบบการคัดเลือกนี้จะสามารถเพิ่มขนาดเมล็ดได้สูงสุด แต่ความยาวเมล็ดที่ยาวมากเกินไปอาจเป็นปัญหาในกระบวนการขัดสี เพราะเมื่อนำมาขัดสีจะทำให้มีข้าวหักมากกว่าข้าวเต็มเมล็ด ในประเทศไทยส่วนใหญ่มีข้าวเมล็ดปานกลางถึงข้าวเมล็ดยาว ซึ่งมีความยาวอยู่ในช่วง 6.20 - 8.00 มม. ดังนั้น จีโนไทป์ที่อาจเป็นทางเลือกอีกแบบหนึ่ง คือ $GL7^{KK}SMG1^{BB}TGW6^{KK}qGL7\text{-}2^{KK}GW10^{KK}qGL10^{BB}$ ซึ่งจะทำให้ทำนายความยาวเมล็ดได้เท่ากับ 7.843 มม. ซึ่งความยาวจะเพิ่มขึ้นจากตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน เท่ากับ 7.843-7.519/7.519x100 = 4.309% ทำนายความกว้างเมล็ดเท่ากับ 2.126 มม. ซึ่งความกว้างจะไม่เปลี่ยนแปลงจากตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน คือ มีค่าเท่ากับ 2.126-2.126/2.126x100 = 0% และทำนายความหนาเมล็ดได้เท่ากับ 1.716 มม. ซึ่งความหนาจะเพิ่มขึ้นจากตัวเปรียบเทียบมาตรฐานเท่ากับ 1.716-1.684/1.684x100 = 1.900% และทำให้ขนาดเมล็ดเพิ่มขึ้นรวมจากตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน เท่ากับ 6.209%

ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนไม่น้อยที่พยายามศึกษาการทำงานร่วมกันของยีนในวิถีควบคุมขนาดเมล็ด มีการศึกษาอิทธิพลของการรวมอัลลีลจากยีน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ *GS3 GS5 GS6 GW2 GW8/OsSPL16* และ *qSW5/GW5* ต่อลักษณะขนาดเมล็ดข้าว ซึ่งจากผลการรวมกันของอัลลีลเหล่านี้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงด้านขนาดเมล็ด (Lee et al., 2015) เช่นเดียวกับการศึกษาผลของการรวมกันของยีน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 GS3 GW8 GS5 TGW6 WTG1* และ An-1 กับ 5 ลักษณะที่สำคัญ คือ ความยาว ความกว้าง ความหนา อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด จากผลการรวมกันของอัลลีลเหล่านี้พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับขนาดเมล็ดข้าว (Zhong et al., 2020) เนื่องจากขนาดเมล็ดข้าวเป็นลักษณะเชิงปริมาณถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ซึ่งยีนบางตำแหน่งอาจเพิ่มความยาวแต่ในขณะเดียวกันก็ลดความหนาของเมล็ดด้วย และกลไกการทำงานร่วมกันของยีนหลายตำแหน่งมีความซับซ้อนจำเป็นต้องมีการศึกษาในขั้นที่สูงขึ้น และนอกจากนี้สภาพแวดล้อมก็มีผลต่อขนาดของเมล็ดอีกด้วย จึงเป็นการยากที่จะทำนายขนาดเมล็ดได้ถูกต้องแม่นยำ 100% แต่ถึงอย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่สัมพันธ์กับขนาดเมล็ดของการทดลองนี้จะถูกใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง KDML 105-9351(57D) และ Basmati เพื่อคัดเลือกให้ข้าวมีขนาดเมล็ดยาว กว้าง และหนาตามต้องการเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำขึ้นกว่าการคัดเลือกจากฟีโนไทป์เพียงอย่างเดียว และสายพันธุ์ข้าวที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ของงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นตัวให้ยีนขนาดเมล็ดกับข้าวพันธุ์ดีพันธุ์อื่น ๆ ที่มีขนาดเมล็ดเล็กให้มีขนาดเมล็ดใหญ่ขึ้นได้ตามต้องการ แต่ถึงอย่างไรก็ตามเพื่อให้แน่ใจว่า

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกได้ถูกต้องแม่นยำและมีโอกาสประสบผลสำเร็จสูงจำเป็นจะต้องมีการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างพันธุ์ให้ยีนและพันธุ์รับ (พันธุ์ที่จะปรับปรุง) เสียก่อน โดยจะต้องมีการเปรียบเทียบบริเวณรหัสรวมถึงบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนในวิถีหรือยีนที่สนใจ เนื่องจากเป็นบริเวณที่สำคัญต่อการแปรรหัสและเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน จึงจะสามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ประชากรอื่น ๆ ได้ ซึ่งในปัจจุบันค่าใช้จ่ายในการอ่านลำดับเบสทั้งจีโนมมีราคาต่ำลง จึงเป็นการง่ายที่จะทำให้การปรับปรุงพันธุ์ในปัจจุบันสะดวกและรวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ขั้นตอนและวิธีการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่สัมพันธ์กับขนาดเมล็ดที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานที่ดีสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์อื่น ๆ และพืชอื่น ๆ ให้มีขนาดเมล็ดหรือลักษณะอื่น ๆ ตามต้องการได้

สรุป

การศึกษาขนาดเมล็ดของพันธุ์แม่ คือ KDML 105-9351(57D) มีความยาว กว้าง และหนาเมล็ดเฉลี่ย 7.20±0.11 2.12±0.03 และ 1.71±0.02 มม. ตามลำดับ และพันธุ์พ่อ คือ Basmati มีความยาว กว้าง และหนาเมล็ดเฉลี่ย 7.78±0.15 1.71 ±0.03 และ 1.58±0.02 มม. ตามลำดับ ซึ่งข้าวทั้ง 2 พันธุ์มีค่าเฉลี่ยของขนาดเมล็ดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ จึงถูกนำมาสร้างเป็นประชากรเมล็ด F_5 สำหรับใช้ในการศึกษา ซึ่งพบว่า ประชากรเมล็ด F_5 มีความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 7.95±0.63 1.99±0.14 และ 1.63±0.06 มม. ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ พบว่า ความกว้างและความหนาเมล็ดมีระดับความสัมพันธ์กันสูงในเชิงบวก (r เท่ากับ 0.699) ขณะที่ความยาวและความกว้างเมล็ดมีระดับความสัมพันธ์กันต่ำในเชิงลบ (r เท่ากับ -0.382) ส่วนความยาวและความหนาเมล็ดไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ในงานวิจัยนี้ได้อ่านลำดับเบสทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่ KDML 105-9351(57D) และพันธุ์พ่อ Basmati และนำลำดับเบสในส่วนของ exon และโปรโมเตอร์ของยีนในวิถีควบคุมขนาดของเมล็ดข้าวจำนวน 83 ตำแหน่งมาเปรียบเทียบหาตำแหน่งที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ ทำการค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนได้ 29 ตำแหน่งที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous ของอัลลีลพันธุ์แม่กับอัลลีลพันธุ์พ่อ และ heterozygous ของอัลลีลระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อได้ จึงนำมาใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรเมล็ด F_5 จำนวน 138 กอ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด ด้วยวิธี Simple regression พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 SMG1 TGW6 GS5* และ *GW6a* กับความยาวเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ขณะที่พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *qGL7-2 GL7 GS7 GW10* และ *TGW6* กับความกว้างเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 8 ตำแหน่ง ได้แก่ *GL7 qGL7-2 GS7 TGW6 GW6 GW10 GL4* และ *qGL10* กับความหนาเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ เมื่อนำจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับ 3 ลักษณะ ดังกล่าวมาวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณด้วยวิธี Multiple regression พบว่า รูปแบบที่ดีที่สุด คือ การใช้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7 SMG1* และ *TGW6* ร่วมกัน มีความสัมพันธ์กับความยาวเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ มีค่า R^2 เท่ากับ 64.15% ขณะที่การใช้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *qGL7-2 GW10* และ *TGW6* ร่วมกัน มีความสัมพันธ์กับความกว้างเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ มีค่า R^2 เท่ากับ 55.39% และการใช้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *GL7 TGW6 qGL10* และ *GW10* ร่วมกัน มีความสัมพันธ์กับความหนาเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ มีค่า R^2 เท่ากับ 36.60% โดยพบ *GL7* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเมล็ด แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความหนาเมล็ด ซึ่งถ้าคัดเลือกให้มีอัลลีลเหมือนพ่อ คือ Basmati จะเพิ่มความยาวเมล็ดได้ แต่ทำให้ความหนาเมล็ดลดลงด้วย ส่วน *SMG1* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความยาวเมล็ด และ *qGL10* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความหนาเมล็ด ดังนั้น ถ้าใช้ยีน *SMG1* และ *qGL10* ปรับปรุงพันธุ์ของประชากรนี้จะต้องคัดเลือกให้มีอัลลีลเหมือนพ่อ คือ Basmati ซึ่งจะเพิ่มความยาวและความหนาเมล็ดได้ ในขณะที่ *TGW6* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับทั้งความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด เช่นเดียวกับ *GW10* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับทั้งความกว้าง และความหนาเมล็ด ส่วน *qGL7-2* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความกว้างเมล็ด ดังนั้น ถ้าใช้ยีน *TGW6 GW10* และ *qGL7-2* ปรับปรุงพันธุ์ของประชากรนี้จะต้องคัดเลือกให้มีอัลลีลเหมือนแม่ คือ KDML 105-9351(57D) ดังนั้น การคัดเลือกอัลลีลที่เหมาะสมของยีน 6 ตำแหน่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มขนาดเมล็ดในประชากรที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง KDML 105-9351(57D) และ Basmati คือ ยีน *GL7 TGW6 qGL7-2* และ *GW10*

ต้องคัดเลือกให้เป็น homozygous ของอัลลีล KDML 105-9351(57D) ส่วน *SMG1* และ *qGL10* ต้องคัดเลือกให้เป็น homozygous ของอัลลีล Basmati จึงจะสามารถเพิ่มทั้งความยาว ความกว้าง และความหนาเมล็ด ซึ่งมีผลทำให้ขนาดเมล็ดเพิ่มขึ้นและคาดว่าจะทำให้น้ำหนักของเมล็ดหรือผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้นด้วย

ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่สัมพันธ์กับขนาดเมล็ดจะถูกใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง KDML 105-9351(57D) และ Basmati เพื่อคัดเลือกให้ข้าวมีขนาดเมล็ดยาว กว้าง และหนาขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำขึ้น เพื่อเพิ่มผลผลิตข้าวต่อไป นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานที่ดีสำหรับการพัฒนางานปรับปรุงพันธุ์ข้าวหรือพืชอื่น ๆ ได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวระดับโมเลกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์ให้ใช้อุปกรณ์และสารเคมีในการทำการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2566. การหาตำแหน่งยีนและการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (Gene mapping and application in plant breeding). แหล่งข้อมูล: http://www.corsat.agr.ku.ac.th/doc/01003579/144.pdf. ค้นเมื่อ 30 ธันวาคม 2566.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2566. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2565. แหล่งข้อมูล: https://www.oae.go.th/assets/portals/1/ebookcategory/95_yearbook2565/. ค้นเมื่อ 5 กรกฎาคม 2566.

สุทิน ชนะบุญ. 2560. บทที่ 6 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงอนุมาน. สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยด้านสุขภาพเบื้องต้น. (น. 148-160). ขอนแก่น: สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดขอนแก่น.

สุภมาส อังศุโชติ. 2556. การวิเคราะห์ข้อมูลวิจัยเพื่อพัฒนาการเรียนการสอน. เจริญดีมั่นคงการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

สุรีพร เกตุงาม. 2556. การปรับปรุงพันธุ์พืชระดับโมเลกุล. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 307 น.

Agriculture. 2022. Long grain rice varieties: Best choice of consumers. Available: https://k-agriculture.com/long-grain-rice-varieties-best-choice-of-consumers/. Accessed Aug. 13, 2022.

Ali, S.S., S.I. Yasin, T. Latif, and C.M. Rafiq. 2014. Genetic control of grain length and shape in Basmati lines of rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Agricultural Research. 52(1): 25-34.

Archak, S., V. Lakshminarayanareddy, and J. Nagaraju. 2007. High-throughput multiplex microsatellite marker assay for detection and quantification of adulteration in Basmati rice (*Oryza sativa*). Electrophoresis. 28(14): 2396-2405.

Aya, K., T. Hobo, K. Sato-Izawa, M. Ueguchi-Tanaka, H. Kitano, and M. Matsuoka. 2014. A novel AP2-type transcription factor, SMALL ORGAN SIZE1, controls organ size downstream of an auxin signaling pathway. Plant and Cell Physiology. 55(5): 897-912.

Bai, X., L. Luo, W. Yan, M.R. Kovi, W. Zhan, and Y. Xing. 2010. Genetic dissection of rice grain shape using a recombinant inbred line population derived from two contrasting parents and fine mapping a pleiotropic quantitative trait locus *qGL7*. BMC Genetics. 11: 1-11.

Bazrkar-Khatibani, L., B.A. Fakheri, M. Hosseini-Chaleshtori, A. Mahender, N. Mahdinejad, and J. Ali. 2019. Genetic mapping and validation of quantitative trait loci (QTL) for the grain appearance and quality traits in rice (*Oryza sativa* L.) by using recombinant inbred line (RIL) population. International Journal of Genomics. 2019: 3160275.

Bhattacharjee, P., R.S. Singhal, and P.R. Kulkarni. 2002. Basmati rice: a review. International Journal of Food Science and Technology. 37(1): 1-12.

Calingacion, M., A. Laborte, A. Nelson, A. Resurreccion, J.C. Concepcion, V.D. Daygon, R. Mumm, R. Reinke, S. Dipti, P.Z. Bassinello, J. Manful, S. Sophany, K.C. Lara, J. Bao, L. Xie, K. Loaiza, A. El-hissewy, J. Gayin, N. Sharma, S. Rajeswari, S. Manonmani, N.S. Rani, S. Kota, S.D. Indrasari, F. Habibi, M. Hosseini, F. Tavasoli, K. Suzuki, T. Umemoto, C. Boualaphanh, H.H. Lee, Y.P. Hung, A. Ramli, P.P. Aung, R. Ahmad, J.I. Wattoo, E. Bandonill, M. Romero, C.M. Brites, R. Hafeel, H.S. Lur, K. Cheaupun, S. Jongdee, P. Blanco, R. Bryant, N.T. Lang, R.D. Hall, and M. Fitzgerald. 2014. Diversity of global rice markets and the science required for consumer-targeted rice breeding. PLoS One. 9(1): e85106.

Cheng, Y.C., G. Li, M. Yin, T.V. Adegoke, Y.F. Wang, X.H. Tong, J. Zhang, and J.Z. Ying. 2021. Verification and dissection of one quantitative trait locus for grain size and weight on chromosome 1 in rice. Scientific Reports. 11(1): 18252.

Chen, H., H. Yu, W. Jiang, H. Li, T. Wu, J. Chu, P. Xin, Z. Li, R. Wang, and T. Zhou. 2021. Overexpression of ovate family protein 22 confers multiple morphological changes and represses gibberellin and brassinosteroid signalings in transgenic rice. Plant Science. 304: 110734.

Chen, T., L. Luo, Z. Zhao, H. Wang, C. Chen Y. Liu, and W. Xiao. 2023. Fine mapping and candidate gene analysis of *qGL10* affecting rice grain length. The Crop Journal. 11(2): 540-548.

Che R., H.Tong, B. Shi, Y. Liu, S. Fang, D. Liu, Y. Xiao, B. Hu, L. Liu, H. Wang, M. Zhao, and C. Chu. 2016. Control of grain size and rice yield by *GL2*-mediated brassinosteroid responses. Nature Plants. 2(1): 1-8.

Civan, P., S. Ali, R. Batista-Navarro, K. Drosou, C. Ihejieto, D. Chakraborty, A. Ray, P. Gladieux, and T.A. Brown. 2019. Origin of the aromatic group of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) traced to the Indian subcontinent. Genome Biology and Evolution. 11(3): 832-843.

Custodio, M.C., M. Demont, A. Laborte, and J. Ynion. 2016. Improving food security in Asia through consumer-focused rice breeding. Global Food Security. 9: 19-28.

Dong, G., H. Xiong, W. Zeng, J. Li, and D. Du. 2022. Ectopic expression of the rice grain-size-affecting gene *GS5* in maize affects kernel size by regulating endosperm starch synthesis. Genes. 13(9): 1542.

Duan, P., Y. Rao, D. Zeng, Y. Yang, R. Xu, B. Zhang, G. Dong, Q. Qian, and Y. Li. 2014. *SMALL GRAIN 1*, which encodes a mitogen-activated protein kinase kinase 4, influences grain size in rice. The Plant Journal. 77(4): 547-557.

Duan, P., J. Xu, D. Zeng, B. Zhang, M. Geng, G. Zhang, K. Huang, L. Huang, R. Xu, S. Ge, Q. Qian, and Y. Li. 2017. Natural variation in the promoter of *GSE5* contributes to grain size diversity in rice. Molecular Plant. 10(5): 685-694.

Gao, Q., N. Zhang, W.Q. Wang, S.Y. Shen, C. Bai, and X.J. Song. 2021. The ubiquitin-interacting motif-type ubiquitin receptor HDR3 interacts with and stabilizes the histone acetyltransferase *GW6a* to control the grain size in rice. Plant Cell. 33(10): 3331-3347.

Fan, C., Y. Xing, H. Mao, T. Lu, B. Han, C. Xu, X. Li, and Q. Zhang. 2006. *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. Theoretical and applied genetics. 112(6): 1164-1171.

Feng, Y., Q. Lu, R. Zhai, M. Zhang, Q. Xu, Y. Yang, S. Wang, X. Yuan, H. Yu, Y. Wang, and X. Wei. 2016. Genome wide association mapping for grain shape traits in indica rice. Planta. 244(4): 819-830.

Fitzgerald, M.A., S.R. McCouch, and R.D. Hall. 2009. Not just a grain of rice: the quest for quality. Trends in plant science. 14(3): 133-139.

Hori, K., and J. Sun. 2022. Rice grain size and quality. Rice. 15(1): 33.

Hu, J., Y. Wang, Y. Fang, L. Zeng, J. Xu, H. Yu, Z. Shi, J. Pan, D. Zhang, S. Kang, L. Zhu, G. Dong, L. Guo, D. Zeng, G. Zhang, L. Xie, G. Xiong, J. Li, and Q. Qian. 2015. A rare allele of *GS2* enhances grain size and grain yield in rice. Molecular plant. 8(10): 1455-1465.

Hu, Z., S.J. Lu, M.J. Wang, H. He, L. Sun, H. Wang, X.H. Liu, L. Jiang, J.L. Sun, X. Xin, W. Kong, C. Chu, H.W. Xue, J. Yang, X. Luo, and J.X. Liu. 2018. A novel QTL q*TGW3* encodes the GSK3/SHAGGY-like kinase OsGSK5/OsSK41 that interacts with OsARF4 to negatively regulate grain size and weight in rice. Molecular Plant. 11(5): 736-749.

Ishimaru, K., N. Hirotsu, Y. Madoka, N. Murakami, N. Hara, H. Onodera, T. Kashiwagi, K. Ujiie, B.i. Shimizu, and A. Onishi. 2013. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. Nature genetics. 45(6): 707-711.

Kashif, H., Y.X. Zhang, A. Workie, R. Aamir, A. Adil, R. Hasanuzzaman, H. Wang, X.H. Shen, L.Y. Cao, and S.H. Cheng. 2020. Association mapping of quantitative trait loci for grain size in introgression line derived from *Oryza rufipogon*. Rice Science. 27(3): 246–254.

Lee, C.M., J. Park, B. Kim, J. Seo, G. Lee, and S. Jang. 2015. Influence of multi-gene allele combinations on grain size of rice and development of a regression equation model to predict grain parameters. Rice. 8(1): 33.

Li, N., R. Xu, and Y. Li. 2019a. Molecular networks of seed size control in plants. Annual review of plant biology. 70: 435-463.

Li, X., Q. Tao, J. Miao, Z. Yang, M. Gu, G. Liang, and Y. Zhou. 2019b. Evaluation of differential *qPE9-1/DEP1* protein domains in rice grain length and weight variation. Rice. 12(1): 1-10.

Li, P., Y.H. Chen, J. Lu, C.Q. Zhang, Q.Q. Liu, and Q.F. Li. 2022. Genes and their molecular functions determining seed structure, components, and quality of rice. Rice. 15(1): 18.

Liu, Q., R. Han, K. Wu, J. Zhang, Y. Ye, S. Wang, J. Chen, Y. Pan, Q. Li, X. Xu, J. Zhou, D. Tao, Y. Wu, and X. Fu. 2018. G-protein βγ subunits determine grain size through interaction with MADS-domain transcription factors in rice. Nature communications. 9(1): 852.

Li, Y., C. Fan, Y. Xing, Y. Jiang, L. Luo, L. Sun, D. Shao, C. Xu, X. Li, and J. Xiao. 2011. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. Nature genetics. 43(12): 1266-1269.

Luo, J., H. Liu, T. Zhou, B. Gu, X. Huang, Y. Shangguan, J. Zhu, Y. Li, Y. Zhao, Y. Wang, Q. Zhao, A. Wang, Z. Wang, T. Sang, Z. Wang, and B. Han. 2013. An-1 encodes a basic helix-loop-helix protein that regulates awn development, grain size, and grain number in rice. The Plant Cell. 25(9): 3360-3376.

Nagaraju, J., M. Kathirvel, R.R. Kumar, E.A. Siddiq, and S.E. Hasnain. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99(9): 5836-5841.

Ngangkham, U., S. Samantaray, M.K. Yadav, A. Kumar, P. Chidambaranathan, and J.L. Katara. 2018. Effect of multiple allelic combinations of genes on regulating grain size in rice. PLoS One. 13(1): e0190684.

Niu, Y., T. Chen, C. Wang, K. Chen, C. Shen, H. Chen, S. Zhu, Z. Wu, T. Zheng, F. Zhang, and J. Xu. 2021. Identification and allele mining of new candidate genes underlying rice grain weight and grain shape by genome-wide association study. BMC Genomics. 22(1): 602.

Qi, P., Y.S. Lin, X.J. Song, J.B. Shen, W. Huang, J.X. Shan, M.Z. Zhu, L. Jiang, J.P. Gao, and H.X. Lin. 2012. The novel quantitative trait locus *GL3.1* controls rice grain size and yield by regulating Cyclin-T1;3. Cell research. 22(12): 1666-1680.

Rasheed, H., S. Fiaz, M.A. Khan, S. Mehmood, F. Ullah, S. Saeed, S.U. Khan, T. Yaseen, R.M. Hussain, and A. Qayyum. 2022. Characterization of functional genes *GS3* and *GW2* and their effect on the grain size of various landraces of rice (*Oryza sativa*). Molecular Biology Reports. 49(6): 5397-5403.

Segami, S., K. Takehara, T. Yamamoto, S. Kido, S. Kondo, Y. Iwasaki, and K. Miura. 2017. Overexpression of *SRS5* improves grain size of brassinosteroid-related dwarf mutants in rice (*Oryza sativa* L.). Breeding science. 67(4): 393-397.

Shao, G., S. Tang, J. Luo, G. Jiao, X. Wei, A. Tang, J. Wu, J. Zhuang, and P. Hu. 2010. Mapping of *qGL7-2*, a grain length QTL on chromosome 7 of rice. Journal of Genetics and Genomics. 37(8): 523-531.

Shi, C., Y. Ren, L. Liu, F. Wang, H. Zhang, P. Tian, T. Pan, Y. Wang, R. Jing, T. Liu, F. Wu, Q. Lin, C. Lei, X. Zhang, S. Zhu, X. Guo, J. Wang, Z. Zhao, J. Wang, H. Zhai, Z. Cheng, and J. Wan. 2019. Ubiquitin Specific Protease 15 Has an Important Role in Regulating Grain Width and Size in Rice. Plant physiology. 180(1): 381-391.

Shin, Y., Y.J. Won, C. Lee, K.S. Cheon, H. Oh, G.S. Lee, J. Baek, I.S. Yoon, S.L. Kim, Y.S. Cha, K.H. Kim, and H. Ji. 2022. Identification of grain size-related QTLs in Korean japonica rice using genome resequencing and high-throughput image analysis. Agriculture. 12(1): 51.

Si, L., J. Chen, X. Huang, H. Gong, J. Luo, Q. Hou, T. Zhou, T. Lu, J. Zhu, Y. Shangguan, E. Chen, C. Gong, Q. Zhao, Y. Jing, Y. Zhao, Y. Li, L. Cui, D. Fan, Y. Lu, Q. Weng, Y. Wang, Q. Zhan, K. Liu, X. Wei, K. An, G. An, and B. Han. 2016. *OsSPL13* controls grain size in cultivated rice. Nature Genetics. 48(4): 447-456.

Singh, V., A.K. Singh, T. Mohapatra, and R.K. Ellur. 2018. Pusa Basmati 1121–a rice variety with exceptional kernel elongation and volume expansion after cooking. Rice. 11: 1-10.

Song, X.J., T. Kuroha, M. Ayano, T. Furuta, K. Nagai, N. Komeda, S. Segami, K. Miura, D. Ogawa, T. Kamura, T. Suzuki, T. Higashiyama, M. Yamasaki, H. Mori, Y. Inukai, J. Wu, H. Kitano, H. Sakakibara, S.E. Jacobsen, and M. Ashikari. 2015. Rare allele of a previously unidentified histone H4 acetyltransferase enhances grain weight, yield, and plant biomass in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 112(1): 76-81.

Song, X.J., W. Huang, M. Shi, M.Z. Zhu, and H.X. Lin. 2007. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. Nature Genetics. 39(5): 623-630.

Sun, L., X. Li, Y. Fu, Z. Zhu, L. Tan, F. Liu, X. Sun, X. Sun, and C. Sun. 2013. *GS6*, a member of the GRAS gene family, negatively regulates grain size in rice. Journal of Integrative Plant Biology. 55(10): 938-949.

Tanaka, N., M. Shenton, Y. Kawahara, M. Kumagai, H. Sakai, H. Kanamori, J. Yonemaru, S. Fukuoka, K. Sugimoto, and M. Ishimoto. 2020. Whole-genome sequencing of the NARO World Rice Core Collection (WRC) as the basis for diversity and association studies. Plant and Cell Physiology. 61(5): 922-932.

Tong, H., L. Liu, Y. Jin, L. Du, Y. Yin, Q. Qian, L. Zhu, and C. Chu. 2012. DWARF AND LOW-TILLERING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. The Plant Cell. 24(6): 2562-2577.

Wang, L., D. Wang, Z. Yang, S. Jiang, J. Qu, W. He, Z. Liu, J. Xing, Y. Ma, Q. Lin, and F. Yu. 2021. Roles of FERONIA-like receptor genes in regulating grain size and quality in rice. Science China Life Sciences. 64(2): 294-310.

Wang, S., K. Wu, Q. Yuan, X. Liu, Z. Liu, X. Lin, R. Zeng, H. Zhu, G. Dong, Q. Qian, G. Zhang, and X. Fu. 2012. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. Nature Genetics. 44(8): 950-954.

Wang, S., S. Li, Q. Liu, K. Wu, J. Zhang, S. Wang, Y. Wang, X. Chen, Y. Zhang, C. Gao, F. Wang, H. Huang, and X. Fu. 2015a. The *OsSPL16-GW7* regulatory module determines grain shape and simultaneously improves rice yield and grain quality. Nature Genetics. 47(8): 949-954.

Wang, Y., G. Xiong, J. Hu, L. Jiang, H. Yu, J. Xu, Y. Fang, L. Zeng, E. Xu, J. Xu, W. Ye, X. Meng, R. Liu, H. Chen, Y. Jing, Y. Wang, X. Zhu, J. Li, and Q. Qian. 2015b. Copy number variation at the *GL7* locus contributes to grain size diversity in rice. Nature Genetics. 47(8): 944-948.

Weng, J., S. Gu, X. Wan, H. Gao, T. Guo, N. Su, C. Lei, X. Zhang, Z. Cheng, X. Guo, J. Wang, L. Jiang, H. Zhai, and J. Wan. 2008. Isolation and initial characterization of *GW5*, a major QTL associated with rice grain width and weight. Cell Research. 18(12): 1199-1209.

Wu, W., X. Liu, M. Wang, R.S. Meyer, X. Luo, M.N. Ndjiondjop, L. Tan, J. Zhang, J. Wu, H. Cai, C. Sun, X. Wang, R.A. Wing, and Z. Zhu. 2017. A single-nucleotide polymorphism causes smaller grain size and loss of seed shattering during African rice domestication. Nature Plants. 3(6): 1-7.

Xia, D., H. Zhou, R. Liu, W. Dan, P. Li, B. Wu, J. Chen, L. Wang, G. Gao, Q. Zhang, and Y. He. 2018. *GL3.3*, a novel QTL encoding a GSK3/SHAGGY-like kinase, epistatically interacts with *GS3* to produce extra-long grains in rice. Molecular Plant. 11(5): 754-756.

Xie, X., M.H. Song, F. Jin, S.N. Ahn, J.P. Suh, H.G. Hwang, and S.R. McCouch. 2006. Fine mapping of a grain weight quantitative trait locus on rice chromosome 8 using near-isogenic lines derived from a cross between *Oryza sativa* and *Oryza rufipogon*. Theoretical and Applied Genetics. 113(5): 885-894.

Xu, C., Y. Liu, Y. Li, X. Xu, C. Xu, X. Li, J. Xiao, and Q. Zhang. 2015. Differential expression of *GS5* regulates grain size in rice. Journal of Experimental Botany. 66(9): 2611-2623.

Yamamuro, C., Y. Ihara, X. Wu, T. Noguchi, S. Fujioka, S. Takatsuto, M. Ashikari, H. Kitano, and M. Matsuoka. 2000. Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. The Plant Cell. 12(9): 1591-1605.

Yang, C., Y. Ma, Y. He, Z. Tian, and J. Li. 2018. *OsOFP19* modulates plant architecture by integrating the cell division pattern and brassinosteroid signaling. The Plant Journal. 93(3): 489-501.

Yang, G., S. Chen, L. Chen, W. Gao, Y. Huang, C. Huang, D. Zhou, J. Wang, Y. Liu, M. Huang, W. Xiao, H. Wang, T. Guo, and Z. Chen. 2019. Development and utilization of functional KASP markers to improve rice eating and cooking quality through MAS breeding. Euphytica. 215(66): 1-12.

Ying, J.Z., M. Ma, C. Bai, X.H. Huang, J.L. Liu, Y.Y. Fan, and X.J. Song. 2018. *TGW3*, a major QTL that negatively modulates grain length and weight in rice. Molecular Plant. 11(5): 750-753.

Yin, W., Y. Xiao, M. Niu, W. Meng, L. Li, X. Zhang, D. Liu, G. Zhang, Y. Qian, and Z. Sun. 2020. ARGONAUTE2 enhances grain length and salt tolerance by activating BIG GRAIN3 to modulate cytokinin distribution in rice. The Plant Cell. 32(7): 2292-2306.

Yu, J., J. Miao, Z. Zhang, H. Xiong, X. Zhu, X. Sun, Y. Pan, Y. Liang, Q. Zhang, R. Rehman, J. Li, H. Zhang, and Z. Li. 2018. Alternative splicing of *OsLG3b* controls grain length and yield in *japonica* rice. Plant Biotechnology Journal. 16(9): 1667-1678.

Zhang, J., D. Zhang, Y. Fan, C. Li, P. Xu, W. Li, Q. Sun, X. Huang, C. Zhang, L. Wu, H. Yang, S. Wang, X. Su, X. Li, Y. Song, M.E. Wu, X. Lian, and Y. Li. 2021. The identification of grain size genes by RapMap reveals directional selection during rice domestication. Nature Communications. 12(1): 5673.

Zhang, L., B. Ma, Z. Bian, X. Li, C. Zhang, J. Liu, Q. Li, Q. Liu, and Z. He. 2020. Grain size selection using novel functional markers targeting 14 genes in rice. Rice. 13: 1-16.

Zhang, X., J. Wang, J. Huang, H. Lan, C. Wang, C. Yin, Y. Wu, H. Tang, Q. Qian, J. Li, and H. Zhang. 2012. Rare allele of *OsPPKL1* associated with grain length causes extra-large grain and a significant yield increase in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 109(52): 21534-21539.

Zhan, P., X. Wei, Z. Xiao, X. Wang, S. Ma, S. Lin, F. Li, S. Bu, Z. Liu, H. Zhu, G. Liu, G. Zhang, and S. Wang. 2021. *GW10*, a member of P450 subfamily regulates grain size and grain number in rice. Theoretical and Applied Genetics. 134(12): 3941-3950.

Zhao, D., C. Zhang, Q. Li, and Q. Liu. 2022. Genetic control of grain appearance quality in rice. Biotechnology Advances. 60: 108014.

Zhao, D.S., Q.F. Li, C.Q. Zhang, C. Zhang, Q.Q. Yang, L.X Pan, X.Y. Ren, J. Lu, M.H Gu, and Q.Q. Liu. 2018. *GS9* acts as a transcriptional activator to regulate rice grain shape and appearance quality. Nature Communications. 9(1): 1240.

Zhong, H., C. Liu, W. Kong, Y. Zhang, G. Zhao, T. Sun, and Y. Li. 2020. Effect of multi-allele combination on rice grain size based on prediction of regression equation model. Molecular Genetics and Genomics. 295: 465-474.

Zhong, Q., Q. Jia, W. Yin, Y. Wang, Y. Rao, and Y. Mao. 2023. Advances in cloning functional genes for rice yield traits and molecular design breeding in China. Frontiers in Plant Science. 14: 1206165.

Zuo, J., and J. Li. 2014. Molecular genetic dissection of quantitative trait loci regulating rice grain size. Annual Review of Genetics. 48: 99-118.