วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

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



การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 และ F_4 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข41 กับ กข81

Development of molecular markers associated with grain number per panicle in F_2 and F_4 populations of a cross between RD41 and RD81 rice varieties

นันทิยาภร วิจิตขะจี[1]*, ยุพเยาว์ คบพิมาย[1], กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง[2] และ วราภรณ์ แสงทอง[1]*

Nanthiyaporn Wijitkhajee[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: จำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวเป็นลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญต่อการเพิ่มผลผลิต เป็นลักษณะเชิงปริมาณที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่งและมีสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง ในประชากรต้น F_2 และ F_4 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข41 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ กับข้าวพันธุ์ กข81 ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ ศึกษาลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากรต้น F_2 และ F_4 ที่ทำการเพาะปลูกในฤดูนาปรัง 2565 และ 2566 ตามลำดับ โดยการใช้เทคโนโลยี whole genome sequencing (WGS) นำข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อไปอ่านลำดับเบสทั้งจีโนม เพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์และอินเดลที่แตกต่างกันภายในรหัสของยีน (exon) ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อได้อย่างชัดเจน จากนั้นนำเครื่องหมายโมเลกุล (จีโนไทป์) ที่ได้ไปหาความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) ของประชากรต้น F_2 และ F_4 ผลจากการวิเคราะห์สมการถดถอยพหุคูณด้วยวิธี Multiple regression พบว่า ในประชากรต้น F_2 เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SMG3, OsPRR1, LARGE2* และ *SPL18* และในประชากรต้น F_4 เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* และ *SMG3* มีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยมีค่า R-squared (R^2) เท่ากับ 26.84% และ 20.86% ตามลำดับ เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงที่ได้จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประชากรที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข41 กับ กข81 โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มมากขึ้นเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไป

คำสำคัญ: ข้าว; เครื่องหมายโมเลกุล; จำนวนเมล็ดต่อรวง; องค์ประกอบผลผลิตข้าว

ABSTRACT: The grain number per panicle is an important agricultural characteristic in increasing the yield. It is a quantitative trait that is controlled by multiple genes and influenced by environmental factors. The objective of this research was to develop molecular markers associated with grain number per panicle in plants of the F_2 and F_4 populations of the cross between the RD41 (female parent) and RD81 (male parent), a variety with a high number of grains per panicle. The grain number per panicle of the F_2 and F_4 populations grown during the dry seasons of

* Corresponding author: nanthiyaporn5260@gmail.com, varapornsangtong@yahoo.com

Received: date; January 24, 2024 Revised: date; March 3, 2025

Accepted: date; April 17, 2025 Published: date; July 16, 2025

2022 and 2023 were recorded, and the molecular markers that are part of or linked to genes controlling the grain number per panicle were developed using whole-genome sequencing data of the maternal and paternal rice varieties. The obtained molecular markers (genotypes) were then analyzed for their relationship with the number of grains per panicle (phenotype) in the F_2 and F_4 populations using multiple regression analysis. The results showed that in the F_2 population, molecular markers of genes *SMG3, OsPRR1, LARGE2* and *SPL18,* and in the F_4 population, molecular markers of genes *BG1* and *SMG3* were associated with the number of grains per panicle, with an R-squared (R^2) value of 26.84% in the F_2 population and 20.86% in the F_4 population, respectively. The molecular markers associated with the grain number per panicle will be used in the improvement of rice populations derived from the cross between rice varieties RD41 and RD81 using molecular marker-assisted selection combined with a conventional breeding method to increase the grain number per panicle and enhance yield.
Keywords: rice; molecular markers; grain number per panicle; rice yield component

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารที่มีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก ซึ่งในปี พ.ศ. 2561 ปริมาณการบริโภคข้าวสารของทั่วโลกทั้งหมด 490 ล้านตัน และในปี พ.ศ. 2583 คาดว่าปริมาณการบริโภคข้าวสารของทั่วโลกจะสูงถึง 590 ล้านตัน ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของประชากรโลก และเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของประชากรโลกที่เพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นต้องผลิตข้าวเพิ่มมากขึ้นเป็นสองเท่า ดังนั้น การเพิ่มผลผลิตของข้าวจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมากในการเพิ่มความมั่นคงในด้านอาหารของโลก โดยปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพของข้าวถือเป็นรากฐานในการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าว (Fitzgerald et al., 2009; Ito, 2019; Muthayya et al., 2014) ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยทั้งในด้านการบริโภคและด้านสินค้าเกษตรส่งออกต่างประเทศ การปลูกข้าวของไทยมีความสำคัญอย่างมากต่อภาวะเศรษฐกิจภูมิภาค ซึ่งครอบคลุมพื้นที่การเพาะปลูกมากที่สุดคิดเป็น 43.38 ของพื้นที่การเกษตรทั้งหมดของประเทศ และมีจำนวนครัวเรือนที่ปลูกข้าวมากถึง 4.68 ล้านครัวเรือน คิดเป็น 60.62% ของจำนวนครัวเรือนภาคเกษตรทั้งหมดทั้งหมด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) ในปี พ.ศ. 2562-2565 ประเทศไทยมีผลผลิตข้าวอยู่ในระดับที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตต่อไร่กับเวียดนามและอินเดียที่เป็นคู่แข่งสำคัญ โดยผลผลิตต่อไร่ของไทยเฉลี่ย 478 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งอยู่ในระดับที่น้อยมาก ขณะที่ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ของจีนอยู่ที่ 1,138 กิโลกรัมต่อไร่ เวียดนาม 972 กิโลกรัมต่อไร่ บังคลาเทศ 779 กิโลกรัมต่อไร่ และอินเดีย 674 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งเห็นได้ว่าผลผลิตข้าวต่อไร่ของไทยต่ำกว่าประเทศผู้ผลิตอื่นๆ ส่วนในด้านเศรษฐกิจการส่งออกข้าว ในปี พ.ศ. 2566 ไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวมากเป็นอันดับ 3 ของโลก ปริมาณการส่งออกข้าวไทย 6.08 ล้านตัน รองจากอินเดียและเวียดนาม ที่มีปริมาณการส่งออกข้าว 15.50 และ 6.42 ล้านตัน ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2566) แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่าต้นทุนการผลิตข้าวของไทยค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับประเทศคู่แข่งอย่างเวียดนาม และปัญหาอีกอย่างของไทยคือยังไม่มีพันธุ์ข้าวที่ดีและให้ผลผลิตสูงที่สามารถสู้ราคาในระยะยาวกับเวียดนามได้ เพราะข้าวเวียดนามมีผลผลิตสูงกว่าข้าวไทยถึง 414 กิโลกรัมต่อไร่ (อัทธ์, 2554)

การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ข้าวมีผลผลิตสูงมีความสำคัญมาก ซึ่งมีปัจจัยหลายประการเข้ามามีอิทธิพลต่อผลผลิต ได้แก่ พันธุกรรมของพันธุ์ข้าว สภาพแวดล้อม และการจัดการดูแลรักษาของข้าว ปัจจัยเหล่านี้เป็นส่วนสำคัญที่ช่วยให้เกษตรกรได้ผลผลิตข้าวที่สูงขึ้นและทำให้เกษตรกรมีรายได้และคุณภาพการดำรงชีวิตที่ดีขึ้น (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์กรมหาชน, 2567) การเพิ่มผลผลิตข้าวสามารถทำได้โดยการเพิ่มองค์ประกอบของผลผลิตซึ่งประกอบด้วย จำนวนรวง จำนวนเมล็ดต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี และน้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ด (Yoshida, 1981) ซึ่งสามารถเพิ่มองค์ประกอบลักษณะใดลักษณะหนึ่งหรืออาจเพิ่มมากกว่าหนึ่งลักษณะพร้อมกันเพื่อส่งเสริมทำให้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น แต่ในการเพิ่มองค์ประกอบของผลผลิตลักษณะหนึ่งอาจไปทำให้ลักษณะอื่นลดลงได้ องค์ประกอบของผลผลิตในแต่ละลักษณะมีความแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมและพันธุกรรม (พีระศักดิ์, 2526) การเพิ่มจำนวนเมล็ดต่อรวงเป็นหนทางที่ดีที่สุดในการเพิ่มผลผลิตของข้าว ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มจำนวนเมล็ดโดยการแตกกอ การแตกแขนงของรวง ความยาวของรวงและเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด ซึ่งลักษณะข้างต้นมีฮอร์โมนพืชที่สามารถทำหน้าที่ควบคุมได้ (Deveshwar et al., 2020; Gouda et al., 2020) จำนวนเมล็ดต่อรวงถือเป็นลักษณะที่สำคัญในการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น (Huo et al., 2017; Wu et al., 2021) เป็นลักษณะเชิงปริมาณที่มีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง และถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ตัวอย่างเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะโครงสร้างของรวง ได้แก่ ยีน *sped1-D* (Jiang et al., 2014), *RGN1* (Li et al., 2022a),

LOG (Kurakawa et al., 2007), *IPA1*, *OsSPL14* (Jiao et al., 2010) ส่วนยีน *OsSPL18* ซึ่งทำหน้าที่ในควบคุมโครงสร้างของรวงและจำนวนเมล็ด โดยถูกควบคุมผ่านการทำงานของยีน *DEP1* (Yuan et al., 2019) ขณะที่ยีน *DEP1* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ deletion จะส่งเสริมการส่งสัญญาณของ G-protein ทำให้รูปร่างของรวงตั้งตรง แต่กลับทำให้ความยาวของรวงสั้นลง (Huang et al., 2009; Zhou et al., 2009) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแตกแขนงของรวง ได้แก่ ยีน *Gn1a* (Ashikari et al., 2005), *PAP2/ MADS34* (Gao et al., 2010), *LAX2* (Tabuchi et al., 2011; Zhang et al., 2018), *NOG1* (Huo et al., 2017), *APO2* (Ikeda-Kawakatsu et al., 2012), *NAL1* (Huang et al., 2018), *FON4* (Chu et al., 2006; Ren et al., 2019) โดยยีน *LARGE2* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 โดยมียีน *OsUPL2* ควบคุมการสร้าง E3 ubiquitin ligase ที่ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของโปรตีนในโดเมน Homology to E6-AP Carboxy Terminus (HECT) (Fitzgerald et al., 2009; Callis, 2014; Yau and Rape, 2016; Zheng and Shabek, 2017) ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีน *large2* ทำให้เกิดโครงสร้างของรวงที่ใหญ่และมีจำนวนเมล็ดเพิ่มมากขึ้น (Huang et al., 2021) และ *RCN1* (Li et al., 2022a) ยีนที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนพืช ได้แก่ *BG1* (Liu et al., 2015), *GSN1* (Guo et al., 2018; Xu et al., 2018; Wang et al., 2019), *GNP1* (Wu et al., 2016) และ *GID1L2* (Jiang et al., 2014) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการพัฒนาของท่อลำเลียง ได้แก่ *Ghd7* (Xue et al., 2008 and Weng et al., 2014), *NAL1* (Wang et al., 2020), *DEP1, APO1* (Terao et al., 2010), *SP1* (Li et al., 2009), *TAL* (Yang et al., 2015) และ *OsCOMT* (Huangfu et al., 2022) ซึ่งยีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง (Xing and Zhang, 2010)

ข้าวพันธุ์ กข41 เป็นอีกหนึ่งพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูก ซึ่งมีพื้นที่การเพาะปลูกทั้งหมด 2.6 ล้านไร่ เป็นพันธุ์ข้าวเจ้าพื้นแข็งที่ไม่ไวต่อช่วงแสง มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และต้านทานต่อโรคไหม้ ซึ่งมีผลผลิต 722 กิโลกรัมต่อไร่ แต่มีจำนวนเมล็ดดีเฉลี่ยเพียง 105 เมล็ด (ประจักษ์ และคณะ, 2556) ปัจจุบันเกษตรกรมีความต้องการพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูง และตรงต่อความต้องการของการส่งออก ผู้วิจัยจึงหาแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีผลผลิตสูงโดยการเพิ่มจำนวนเมล็ดต่อรวง และพบว่าข้าวพันธุ์ กข81 มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงมากถึง 275 เมล็ด ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่ดี เป็นพันธุ์ข้าวเจ้าพื้นนุ่มที่ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับอุตสาหกรรมการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ข้าวพองอบกรอบ (rice crispy) (กองวิจัยและพัฒนากรมการข้าว, 2559) ในการพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต ปัจจุบันได้มีการเพิ่มศักยภาพ การสร้างองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านจีโนมให้แก่นักวิจัยที่จะนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกเพื่อเลือกต้นที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการ ประโยชน์ในการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก คือ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือก เพิ่มความแม่นยำ และย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ได้ (Collard et al., 2005) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 และ F_4 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์แม่ คือ กข41 กับข้าวพันธุ์พ่อ คือ กข81 โดยการอ่านลำดับเบสทั้งจีโนมด้วยเทคโนโลยี whole-genome sequencing ของข้าวพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ เพื่อใช้วิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์และอินเดลในการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำมาซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้นเพื่อเพิ่มผลผลิตของข้าวไทยในอนาคต

วิธีการศึกษา

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ข้าวพันธุ์ กข41 เป็นข้าวเจ้า ไม่ไวต่อช่วงแสง ได้จากการผสมพันธุ์ 3 ทางระหว่าง ลูกผสมชั่วที่ 1 ของ CNT85059-27-1-3-2 และสุพรรณบุรี 60 ผสมพันธุ์กับ RP217-635-8 ที่สถานีทดลองข้าวชัยนาท

ข้าวพันธุ์ กข81 เป็นข้าวเจ้า ไม่ไวต่อช่วงแสง ได้จากการนำเมล็ดพันธุ์ข้าวสายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B line) IR95760-36-9 โดยได้คัดเลือกจากประชากรชั่วที่ 4 ของโครงการความร่วมมือพัฒนาข้าวลูกผสม (hybrid rice development consortium : HRDC) ที่สถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ (IRRI) และปลูกคัดเลือกแบบสืบประวัติ (pedigree selection) ที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

ประชากรต้น F_2 จำนวน 128 สายพันธุ์ และ F_4 จำนวน 138 สายพันธุ์ ซึ่งทั้ง 2 ประชากรนี้เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ กข41 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ กับข้าวพันธุ์ กข81 ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ

การปลูกศึกษาและการเก็บข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง

การปลูกเพื่อใช้ศึกษา โดยทำการปลูกทดลอง ณ แปลงนาทดลองของศูนย์ปรับปรุงพันธุ์ข้าว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูนาปรัง 2565 (กุมภาพันธ์-มิถุนายน) เพาะประชากรต้น F_2 วันที่ 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 ทำการปักดำในวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2565 สุ่มเก็บข้อมูลประชากรต้น F_2 จำนวน 128 กอ (สายพันธุ์) นับจำนวนเมล็ดต่อรวงและบันทึกข้อมูลนำไปตรวจสอบจีโนไทป์ ในฤดูนาปี 2565 (สิงหาคม-ธันวาคม) นำ 128 กอ (สายพันธุ์) เพาะประชากรต้น F_3 วันที่ 20 สิงหาคม พ.ศ. 2565 ปักดำในวันที่ 17 กันยายน พ.ศ. 2565 ทำการปลูกกอ (สายพันธุ์) ละ 3 แถวๆ ละ 9 กอ สุ่มคัดเลือกสายพันธุ์ละ 1 กอ ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีไปปลูกต่อในฤดูนาปรัง 2566 (มกราคม-มิถุนายน) โดยเพาะปลูกประชากรต้น F_4 จำนวน 128 กอ (สายพันธุ์) วันที่ 28 มกราคม พ.ศ. 2566 ทำการปักดำจำนวน 91 สายพันธุ์ ในวันที่ 5 มีนาคม พ.ศ. 2566 เนื่องจากมีข้าวบางสายพันธุ์งอกไม่ดีทำให้เหลือเพียง 91 สายพันธุ์ จึงปลูกได้สายพันธุ์ละ 2 ถึง 3 แถว จากนั้นสุ่มเก็บข้อมูลสายพันธุ์ละ 2 กอ จาก 91 สายพันธุ์ (ต้น F_4) รวมทั้งหมดมี 182 กอ ในตอนแรกจะนำสายพันธุ์ละ 1 กอ รวมเป็น 91 กอ (สายพันธุ์) ไปตรวจสอบจีโนไทป์ แต่ตัวอย่างมีน้อยเกินไป จึงทำการสุ่มเพิ่มอีก 47 กอ จาก 91 กอที่เหลือของ 91 สายพันธุ์ ดังนั้นจึงมีตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งสิ้น 138 ตัวอย่าง (กอ) โดยทั้ง 3 ฤดูทำการปลูกข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ การดูแลรักษาหลังปักดำใส่ปุ๋ยเคมีจำนวน 4 ครั้ง โดยแบ่งใส่เมื่อข้าวอายุ 7, 14, 30 และ 45 วันหลังปักดำ ดังนี้ ครั้งที่ 1 หลังปักดำ 7 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 ครั้งที่ 2 และ 3 หลังปักดำ 14 และ 30 วัน ตามลำดับ ใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 ผสมกับปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 และครั้งที่ 4 หลังปักดำ 45 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 ผสมกับปุ๋ยเคมีสูตร 0-0-60 โดยปริมาณ ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส : โพแทสเซียม ทั้งหมดเท่ากับ 17 : 8 : 11 กิโลกรัมต่อไร่ตามลำดับ การเก็บเกี่ยวเพื่อไปบันทึกลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงของแต่ละกอ จะเก็บเกี่ยวเมื่อต้นข้าวอยู่ในระยะพลับพลึง จากนั้นเก็บเกี่ยวกอละ 10 รวง ของข้าวพันธุ์แม่ ข้าวพันธุ์พ่อ และประชากรต้น F_2 และ F_4 ทำการนับจำนวนเมล็ดและหาค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของแต่ละกอ จากนั้นนำเมล็ดบนต้น F_2 และ F_4 ของแต่ละกอมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาจีโนไทป์ต่อไป

การวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์และอินเดลจากการอ่านลำดับทั้งจีโนม (whole genome sequence; WGS) และค้นหาหรือออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

การอ่านลำดับทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการอ่านลำดับทั้งจีโนม ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 กับข้าวพันธุ์พ่อ กข81 กับบริษัท Novogene Biotech ประเทศจีน โดยการอ่านลำดับทั้งจีโนมถูกเทียบเข้ากับจีโนมอ้างอิงของข้าว คือ *Oryza sativa* ssp. *japonica* Nipponbare (Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0) ในการวิเคราะห์ข้อมูลระดับจีโนมโดยห้างหุ้นส่วน จำกัด วอร์ด เมดิก ประเทศไทย ซึ่งการวิเคราะห์ข้อมูลระดับจีโนมเพื่อหาตำแหน่งสนิปส์ (single nucleotide polymorphisms; SNPs) และอินเดล (insertion/deletion; InDel) ที่ต่างกันภายในยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมจำนวนเมล็ดต่อรวงและผลผลิตของข้าวพันธุ์แม่ (กข41) และพันธุ์พ่อ (กข81) การวิเคราะห์ทางสารสนเทศสำหรับข้อมูลระดับจีโนมมีขั้นตอนอย่างย่อดังนี้ 1) ตรวจสอบคุณภาพของ FASTQ file ที่ได้จากการตรวจจรหัสพันธุกรรม และตัดเล็ม (trimming) ข้อมูลเพื่อให้ได้ FASTQ file ที่มีคุณภาพสูงสุด 2) จัดวาง sequence บนจีโนมอ้างอิง 3) กระบวนการคัดกรองเริ่มจากการค้นหาและตัด sequence ที่ซ้ำ (duplication) ถัดไปจะเป็นการสร้าง index file และปรับข้อมูลคุณภาพ (base quality score recalibration) เพื่อลด systematic error ก่อนเข้าสู่กระบวนการกรองเฉพาะตำแหน่งซึ่งมีความแตกต่างจากลำดับเบสบนจีโนมอ้างอิง (variant calling) และข้าวพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ ซึ่งจะทำให้ได้ Variant Calling File (VCF) เพื่อเตรียมไฟล์สำหรับการวิเคราะห์ต่อเนื่อง ซึ่งไฟล์ VCF จะบรรจุความแปรผันทางพันธุกรรมแบบสนิปส์ (SNPs) และอินเดล (InDel) และ 4) การบรรจุข้อมูล annotation ได้แก่ ประเภทของ variant เช่น Missense, Synonymous, Nonsynonymous, Stop gain, Stop-loss และ Frameshift เป็นต้น

การวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ (SNPs) และอินเดล (InDel) โดยนำผลข้อมูลที่ได้จากการอ่านลำดับทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อมาเปรียบเทียบบริเวณรหัส (exon) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงทั้งวิถี ด้วยโปรแกรม Integrative Genomics Viewer (IGV) การค้นหาตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ได้แก่ Single nucleotide polymorphisms (SNPs), Insertions และ Deletions ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ซึ่งมี 4 แบบ ดังนี้ 1) Nonsynonymous คือ การ

แทนที่คู่เบสแล้วส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปจากปกติ 2) Stop-gain คือ การแทนที่คู่เบสแล้วส่งผลให้เกิดรหัสหยุด (stop codon) ทำให้กรดอะมิโนสั้นกว่าปกติ 3) Stop-loss คือ การแทนที่คู่เบสบริเวณรหัสหยุดแล้วส่งผลให้สูญเสียรหัสหยุดจากตำแหน่งปกติแล้วทำให้กรดอะมิโนยาวกว่าปกติ และ 4) Frameshift คือ การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเบสตั้งแต่ 1 เบส แล้วส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปจากปกติ ณ ตั้งแต่ลำดับนั้น การเปลี่ยนแปลงรูปแบบดังกล่าวนี้ จะส่งผลกระทบต่อกรดอะมิโนและอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้

การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat; SSR) ที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ขนาบข้างหน้าและข้างหลังของยีน ซึ่งได้รวบรวมที่ตำแหน่งต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลจากทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว เป็นข้อมูลที่ได้จาก IRGSP (international rice genome sequencing project [IRGSP], 2005) GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และ RAP-DB (https://rapdb.dna.affrc.go.jp/) The Rice Annotation Project (RAP) ที่มีพันธุกรรมข้าวพันธุ์ Nipponbare เป็นต้นแบบฐานพันธุกรรม นอกจากนี้ยังได้ทำการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน โดยการนำลำดับทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อมาเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalX2.1 การออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ Primer3 (https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) จากนั้นทำการสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ (เครื่องหมายโมเลกุล) ทั้งหมดจากบริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์จำกัด และนำเครื่องหมายโมเลกุลไปตรวจสอบเพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับข้าวพันธุ์พ่อในลำดับถัดไป

การตรวจสอบและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับข้าวพันธุ์พ่อ และนำไปตรวจสอบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรที่สร้างขึ้น

การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเมล็ดข้าวเปลือกของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ข้าวพันธุ์พ่อ กข81 และลูกผสม F_1 โดยใช้ชุดสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Genomic DNA purification kit Cat no.K0512 ของบริษัท Thermo Scientific™) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Fermentas นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น T100 Thermal cycler (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) จีโนมิกส์ดีเอ็นเอประมาณ 50 นาโนกรัม ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.6 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ระยะที่ 1 pre-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ระยะที่ 2 denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ระยะที่ 3 annealing ที่อุณหภูมิ 50-62 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิ annealing ที่ใช้ขึ้นอยู่กับค่า Tm ของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุล) 30 วินาที ระยะที่ 4 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยทำซ้ำจากระยะที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

การตรวจสอบผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยผสมสารสีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (INTRON Biotecnology, Korea) ลงในสารละลายเจลเข้มข้น 4% ก่อนเทเจล จากนั้นอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรสในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า กระแสไฟฟ้าและระยะเวลาตามความเหมาะสมของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุล เมื่อครบเวลาทำการบันทึกภาพด้วยเครื่อง Molecular Imager®Gel DocTM XR+System (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟท์แวร์ Image Lab™ Software (บริษัท BIO-RAD Laboratory) จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอต่างกันอย่างชัดเจน (polymorphic band pattern) โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอนั้นต้องสามารถจำแนกความแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ในส่วนของลูกผสม F_1 จะให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมือนข้าวพันธุ์แม่ 1 แถบ และ ข้าวพันธุ์พ่อ 1 แถบ (heterozygous band pattern) ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้จะถูกนำไปใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรที่สร้างขึ้นต่อไป

การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรต้น F_2 และ F_4 ทำการสุ่มเมล็ดข้าวเปลือกจำนวน 6 เมล็ดต่อกอ มาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอสำเร็จรูปเช่นเดียวกับการสกัดจีโนมิกส์ของข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อ จากนั้น

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่คัดเลือกได้จากข้างต้น แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส จากนั้นบันทึกผลโดยกำหนดสัญลักษณ์จีโนไทป์เพื่อการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ ดังนี้ สัญลักษณ์ RR คือ ต้นที่แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ กข41 จีโนไทป์แบบ homozygous ของข้าวพันธุ์แม่ ให้คะแนนเป็น 0 สัญลักษณ์ DD คือ ต้นที่แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ กข81 จีโนไทป์แบบ homozygous ของข้าวพันธุ์พ่อ ให้คะแนนเป็น 2 และสัญลักษณ์ RD คือ ต้นที่แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ กข41 และ กข81 มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากรที่สร้างขึ้น

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่เกี่ยวกับจำนวนเมล็ดต่อรวง (จีโนไทป์) กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) ของประชากรต้น F_2 และ F_4 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ R version 4.2.1 โดยใช้วิธีทางสถิติ ดังนี้

1) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ของประชากรต้น F_2 และ F_4 ด้วยวิธี One-way analysis of variance, completely random design (one-way ANOVA; CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่แบบ Least significant difference (LSD) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาพจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะฟีโนไทป์ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของฟีโนไทป์เมื่อจำแนกตามจีโนไทป์ คือ RR (อัลลีล homozygous ของ กข41), RD (อัลลีล heterozygous ของ กข41 และ กข81) และ DD (อัลลีล homozygous ของ กข81)

2) การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสองตัว คือ จีโนไทป์กับฟีโนไทป์ ด้วยวิธี Pearson correlation เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) โดยค่าที่ได้อยู่ระหว่าง -1.0 ถึง +1.0 ถ้าค่า r เข้าใกล้ -1.0 แสดงว่าตัวแปรทั้งสองตัวมีความสัมพันธ์กันในเชิงตรงกันข้าม (เชิงลบ) หากค่า r เข้าใกล้ +1.0 แสดงว่า ตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน (เชิงบวก) และถ้าตัวแปรทั้งสองมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0 แสดงว่า ตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน (สุภมาส, 2556)

3) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ ด้วยการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) วิธี Simple regression และ Multiple regression ใช้การเลือกตัวแปรโดยวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน (stepwise regression) เพื่อหาสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient; b) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2)

ผลการศึกษา

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (จำนวนเมล็ดต่อรวง)

การศึกษาลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ของข้าวพันธุ์แม่ข้าวพันธุ์พ่อ และประชากรที่สร้างขึ้น จากการเก็บข้อมูลข้าวในระยะพลับพลึงจำนวน 10 รวงต่อกอ นำมานับจำนวนเมล็ดต่อรวง เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 (30 กอ) และข้าวพันธุ์พ่อ กข81 (30 กอ) พบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข81 ในฤดูนาปรัง 2565 และฤดูนาปรัง 2566 เท่ากับ 283.40 ± 21.96 เมล็ด และ 302.30 ± 38.21 เมล็ด ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าข้าวพันธุ์ กข41 ที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงเท่ากับ 200.00 ± 28.00 เมล็ด และ 159.24 ± 12.30 เมล็ด ตามลำดับ อยู่ประมาณ 60-120 เมล็ด ส่วนค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากรที่สร้างขึ้น คือ ต้น F_2 และ F_4 จากการสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 128 และ 138 ต้น ตามลำดับ พบว่ามีค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวง เท่ากับ 240.60 ± 42.32 และ 260.14 ± 51.21 เมล็ด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างข้าวพันธุ์ กข41 ข้าวพันธุ์ กข81 และประชากรต้น F_2 และ F_4 ที่ปลูกในฤดูเดียวกัน ด้วยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่แบบ LSD พบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของ 10 รวง ที่ปลูกในฤดูนาปรัง 2565 และนาปรัง 2566 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม (**Table 1**) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของ 10 รวง ของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 เป็นกลุ่มที่ 1 (a) ประชากรต้น F_2 และ F_4 เป็นกลุ่มที่ 2 (b) และข้าวพันธุ์แม่ กข41 เป็นกลุ่มที่ 3 (c)

Table 1 Comparing the means of the grain number per panicle among the female parent, male parent, F_2 and F_4 plant populations using ANOVA followed by the LSD test

Treatment	No. of plants	Grain number per panicle (seed)					*p*-value
		Min	Median	Max	Mean	SD	
RD41	30	156.00	202.00	233.00	200.00^{c}	28.00	
RD81	30	229.00	284.00	338.00	283.40^{a}	21.96	0.000**
F_2 plant population	128	144.00	235.00	387.00	240.60^{b}	42.32	
RD41	30	137.70	158.44	186.70	159.25^{c}	12.30	
RD81	30	207.50	299.82	386.50	302.30^{a}	38.21	0.000**
F_4 plant population	138	174.00	255.90	398.67	260.14^{b}	51.21	

**Significance at $p<0.01$, RD41: Female parent, RD81: Male parent, F_2 and F_4 plant populations: progenies of RD41 and RD81 rice varieties, SD: Standard deviation, Means with the same letter are not significantly different from each other ($p<0.01$ ANOVA followed by LSD test).

การวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์และอินเดลจากการอ่านลำดับเบสทั้งจีโนม (whole genome sequence; WGS) และค้นหาหรือออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

งานวิจัยนี้ศึกษายีนทั้งหมดจำนวน 98 ตำแหน่ง (Deveshwar et al., 2020; Gouda et al., 2020; Li et al., 2021 and Lu et al., 2022) ที่ควบคุมลักษณะที่เกี่ยวข้องกับจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าว จากการอ่านลำดับทั้งจีโนม (WGS) และเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสที่เกิดจากตำแหน่งสนิปส์และอินเดล ระหว่างข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อบริเวณรหัสของยีน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงส่งผลต่อกรดอะมิโนโดยแบ่งเป็น 4 รูปแบบ ดังนี้ 1) แบบ Nonsynonymous 2) แบบ Frameshift 3) แบบ Stop-loss และ 4) แบบ Stop-gain โดยการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบดังกล่าวอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน พบว่ามียีน 20 ตำแหน่ง มีการกลายพันธุ์แบบสนิปส์ ที่ต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อ (**Table 2**)

การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง จำนวน 20 ตำแหน่ง ได้ 50 เครื่องหมาย แบ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์จำนวน 8 เครื่องหมาย จากยีน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *Ghd7* (RM5436), *APO2* (RM17414 และ RM5503), *FON4* (RM26998 และ RM26999), *NAL1* (RM3534 และ RM3687) และ *LARGE2* (RM28082) ซึ่งได้รวบรวมเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์จากเว็บไซต์ The Rice Annotation Project (RAP) โดยมีข้าวพันธุ์ Nipponbare เป็นต้นแบบฐานพันธุกรรม และได้ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดล จำนวน 42 เครื่องหมายที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีน 15 ตำแหน่ง (บริเวณ exon, intron, promotor, upstream และ downstream) ได้แก่ ยีน *Dep1, MOC1, MED25, qGN4-1*, *SMG3*, *Sped1D, EBS, GSN1, PAY1, RCN1, SPL18, BG1, MFS2, OsPRR1* และ *OsSPL7* (**Table 2**)

การตรวจสอบและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับข้าวพันธุ์พ่อ และนำไปตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรที่สร้างขึ้น

ในการตรวจสอบและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อ โดยนำเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 50 เครื่องหมายข้างต้นมาตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์และวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส ซึ่งคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลของยีนได้จำนวน 20 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงแถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic bands แบบ co-dominance marker) ทั้งหมด คือ สามารถแยกระหว่างจีโนไทป์ที่เป็น homozygous และ heterozygous โดยคัดเลือกยีนละหนึ่งเครื่องหมาย ดังนี้ เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ที่ยึดติดกับยีน *APO2*, *NAL1*, *Ghd7*, *FON4* และ *LARGE2* เลือกใช้เครื่องหมาย RM17414, RM3534, RM5436, RM26998 และ RM28082 ตามลำดับ **(Figure 1a-e)** เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดลที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน

(บริเวณ exon และ intron) *SMG3*, *MOC1*, *MED25* และ *Dep1* เลือกใช้เครื่องหมาย SMG3 exon1 NW-2, MOC1 Os300 exon1 NW-1, MED25 exon15 NW-3 และ Dep1 Intron4 NW2 ตามลำดับ **(Figure 1f-i)** เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอินเดลที่ยึดติดกับยีน (บริเวณ upstream และ downstream) *OsPRR1, BG1, RCN1, OsSPL7, MFS2, qGN4-1, EBS, GSN1, Sped1D, PAY1* และ *SPL18* เลือกใช้เครื่องหมาย OsPRR1 down2 NW-1, BG1 down2 NW-1, RCN1 down NW-1, OsSPL7 down1 NW-2, MFS2 up1 NW-1, qGN4-1 up1 NW-1, EBS up NW-1, GSN1 down NW-3, Sped1D up NW-1, PAY1 down NW-2 และ SPL18 up NW-1 ตามลำดับ **(Figure 1j-t)** จากนั้นนำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไปตรวจสอบกับประชากรต้น F_2 และ F_4

เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงของยีนทั้ง 20 ตำแหน่ง ข้างต้น (**Figure 1a-t**) ถูกนำมาใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากรต้น F_2 และ F_4 จำนวน 128 และ 138 กอ (สายพันธุ์) ตามลำดับ พบว่า ทุกเครื่องหมายโมเลกุลสามารถแยกกลุ่มจีโนไทป์ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าวพันธุ์ กข41 กลุ่มที่ 2 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าวพันธุ์ กข81 และกลุ่มที่ 3 มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ เหมือนข้าวพันธุ์ กข41 และ กข81 ซึ่งกำหนดสัญลักษณ์จีโนไทป์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ ดังนี้ สัญลักษณ์ RR มีจีโนไทป์แบบ homozygous คือ กอที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าวพันธุ์แม่ คือ กข41 ให้คะแนนเป็น 0, สัญลักษณ์ DD มีจีโนไทป์แบบ homozygous คือ กอที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าวพันธุ์พ่อ คือ กข81 ให้คะแนนเป็น 2 และสัญลักษณ์ RD มีจีโนไทป์แบบ heterozygous คือ กอที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าวพันธุ์ กข41 และ กข81 ให้คะแนนเป็น 1 (**Figure 2a-d**)

Table 2 Detailed information for the 20 molecular markers of genes involved in controlling grain number per panicle and the insertion/deletion (indel) positions for the design of new markers

No.	Genes	ID gene	Chr.	Reference of genes	Type of mutation	Annotation	Variety of sequence		Primer name	Gene distance (bp)	Distance base (bp)	Product size (bp)	Sources of molecular markers
							RD41	RD81					
1	*OsPRR1*	Os02g0618200	2	Wang et al. (2020)	nonsynonymous[1/]	exon6:c.G754A:p.V252I,	A	G	OsPRR1 down1 NW-1	18,208	8	123	new design
									OsPRR1 down2 NW-1	55,512	32	269	new design
									OsPRR1 up1 NW-1	38,021	33	287	new design
									OsPRR1 up2 NW-3	296,511	23	228	new design
2	*BG1*	Os03g0175800	3	Liu et al. (2015)	nonsynonymous[1/]	exon1:c.A202T:p.N68Y,	A	T	BG1 down1 NW-1	18,428	10	106	new design
									BG1 down2 NW-1	25,782	10	146	new design
									BG1 up1 NW-1	6,833	9	139	new design
									BG1 up2 NW-1	28,352	26	225	new design
3	*RCN1*	Os03g0281900	3	Li et al. (2022a)	nonsynonymous[1/]	exon1:c.G1363A:p.V455M,	A	G	RCN1 up NW-1	1,071	8	123	new design
									RCN1 down NW-1	19,356	21	250	new design
4	*SMG3*	Os03g0410000	3	Li et al. (2022b)	nonsynonymous[1/]	exon1:c.C76T:p.P26S,	C	T	SMG3 exon1 NW-2	exon 1	12	171	new design
						exon1:c.A71G:p.H24R,	A	G	SMG3 down NW-1	64,387	9	134	new design
						exon1:c.G62A:p.G21E,	G	A	SMG3 up1 NW-2	326	8	188	new design
						exon1:c.C29T:p.P10L,	C	T	SMG3 up2 NW-1	7,026	10	168	new design
						exon1:c.G10A:p.D4N,	G	A					
5	*OsSPL7*	Os04g0551500	4	Dai et al. (2018)	nonsynonymous[1/]	exon3:c.G878C:p.R293P,	G	C	OsSPL7 down1 NW-2	146,422	16	190	new design
									OsSPL7 down2 NW-1	177,695	22	260	new design
									OsSPL7 up1 NW-1	83,548	25	272	new design
									OsSPL7 up2 NW-2	100,387	26	243	new design
6	*MFS2*	Os04g0566600	4	Li et al. (2020)	nonsynonymous[1/]	exon6:c.A665G:p.N222S,	G	A	MFS2 down1 NW-1	311,159	10	137	new design
									MFS2 down2 NW-2	343,762	26	229	new design
									MFS2 up1 NW-1	463,615	14	141	new design
									MFS2 up2 NW-1	477,973	8	109	new design
7	*APO2*	Os04g0598300	4	Ikeda-Kawakatsu et al. (2012)	nonsynonymous[1/]	exon2:c.C417G:p.D139E,	C	G	RM17414	181,886	ATAG (3)	137	The Rice Annotation Project (RAP)
									RM5503	177,764	AG (27)	201	

Table 2 (continued)

No.	Genes	ID gene	Chr.	Reference of genes	Type of mutation	Annotation	Variety of sequence		Primer name	Gene distance (bp)	Distance base (bp)	Product size (bp)	Sources of molecular markers
							RD41	RD81					
8	*NAL1*	Os04g0615000	4	Huang et al. (2018)	nonsynonymous[1/]	exon5:c.T1424C:p.V475A,	C	T	RM3534	1,069	AG (12)	129	The Rice Annotation Project (RAP)
						exon5:c.A1450G:p.I484V,	G	A	RM3687	298,984	GA (15)	164	
9	*qGN4-1*	Os04g0615700	4	Zhou et al. (2018)	nonsynonymous[1/]	exon2:c.C614A:p.A205D,	C	A	qGN4-1 exon3 NW-1	exon 3	8	147	new design
						exon2:c.G1357A:p.V453I,	A	G	qGN4-1 down NW-1	231,025	9	116	new design
						exon3:c.G2842A:p.D948N,	A	G	qGN4-1 up1 NW-1	16,928	15	165	new design
						exon3:c.A2855T:p.K952M,	T	A	qGN4-1 up2 NW-2	17,468	33	264	new design
10	*EBS*	Os05g0591400	5	Dong et al. (2013)	nonsynonymous[1/]	exon2:c.A737T:p.H246L,	T	A	EBS up NW-1	91,265	9	176	new design
						exon2:c.C914A:p.T305K,	A	C	EBS down NW-1	1,736	10	151	new design
11	*GSN1*	Os05g0115800	5	Guo et al. (2018)	nonsynonymous[1/]	exon2:c.G571A:p.V191I,	A	G	GSN1 up NW-1	34,640	11	176	new design
									GSN1 down NW-3	619	20	250	new design
12	*MOC1*	Os06g0610300	6	Zhang et al. (2021)	nonsynonymous[1/]	exon1:c.C131G:p.T44S,	G	C	MOC1 Os300 exon1 NW-1	exon 1	7	128	new design
									MOC1 Os350 exon1 NW-3	exon 1	12	254	new design
13	*sped1-D*	Os06g0597500	6	Jiang et al. (2014)	nonsynonymous[1/]	exon1:c.C1341A:p.N447K,	A	C	Sped1D up NW-1	596,067	7	130	new design
						exon1:c.A1240C:p.I414L,	C	A	Sped1D down NW-1	7,639	12	171	new design
						exon1:c.A209C:p.K70T,	C	A					
14	*Ghd7*	Os07g0261200	7	Weng et al. (2014)	nonsynonymous[1/]	exon2:c.C697G:p.P233A,	C	G	RM5436	76,536	TC (17)	161	The Rice Annotation Project (RAP)
						exon1:c.C332G:p.A111G,	G	C					
15	*PAY1*	Os08g0407200	8	Zhao et al. (2015)	nonsynonymous[1/]	exon1:c.C448A:p.P150T,	C	A	PAY1 up NW-1	13,676	9	132	new design
						exon1:c.G512C:p.G171A,	C	G	PAY1 down NW-2	3,067	14	214	new design
16	*MED25*	Os09g0306700	9	Lin et al. (2022)	nonsynonymous[1/]	exon8:c.C875T:p.T292M,	C	T	MED25 exon15 NW-1	exon 15	9	130	new design
						exon15:c.G2448A:p.M816I,	A	G	MED25 exon15 NW-3	exon 15	27	252	new design
17	*Dep1*	Os09g0441900	9	Huang et al. (2009)	nonsynonymous[1/]	exon4:c.G482A:p.S161N,	A	G	Dep1 intron2 NW2	intron 2	14	197	new design
						:exon5:c.G611A:p.S204N,							
					nonsynonymous[1/]	exon4:c.C704G:p.S235W, :	G	C	Dep1 Intron4 NW2	intron 4	21	357	new design
						exon5:c.C833G:p.S278W,							

Table 2 (continued)

No.	Genes	ID gene	Chr.	Reference of genes	Type of mutation	Annotation	Variety of sequence		Primer name	Gene distance (bp)	Distance base (bp)	Product size (bp)	Sources of molecular markers
							RD41	RD81					
18	*SPL18*	Os09g0507100	9	Yuan et al (2019).	nonsynonymous[1/]	exon3:c.G841T:p.G281C,	G	T	SPL18 up NW-1	96,407	19	232	new design
						exon3:c.G842T:p.G281V,	G	T	SPL18 down NW-1	59,052	11	228	new design
19	*FON4*	Os11g0595400	11	Ren et al. (2019)	nonsynonymous[1/]	exon1:c.C7G:p.R3G,	C	G	RM26998	33,037	AG (12)	138	The Rice Annotation Project (RAP)
									RM26999	23,200	CCG (7)	173	
20	*LARGE2*	Os12g0428600	12	Callis. 2014	nonsynonymous[1/]	exon1:c.T115C:p.S39P,	C	T	RM28082	1,585,195	ATC (10)	291	The Rice Annotation Project (RAP)
						exon2:c.G413A:p.S138N,	G	A					
						exon2:c.A418G:p.K140E,	G	A					
						exon3:c.C779T:p.P260L,	T	C					

Nonsynonymous[1/] refers to a single nucleotide mutation that results in a changed amino acid 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.

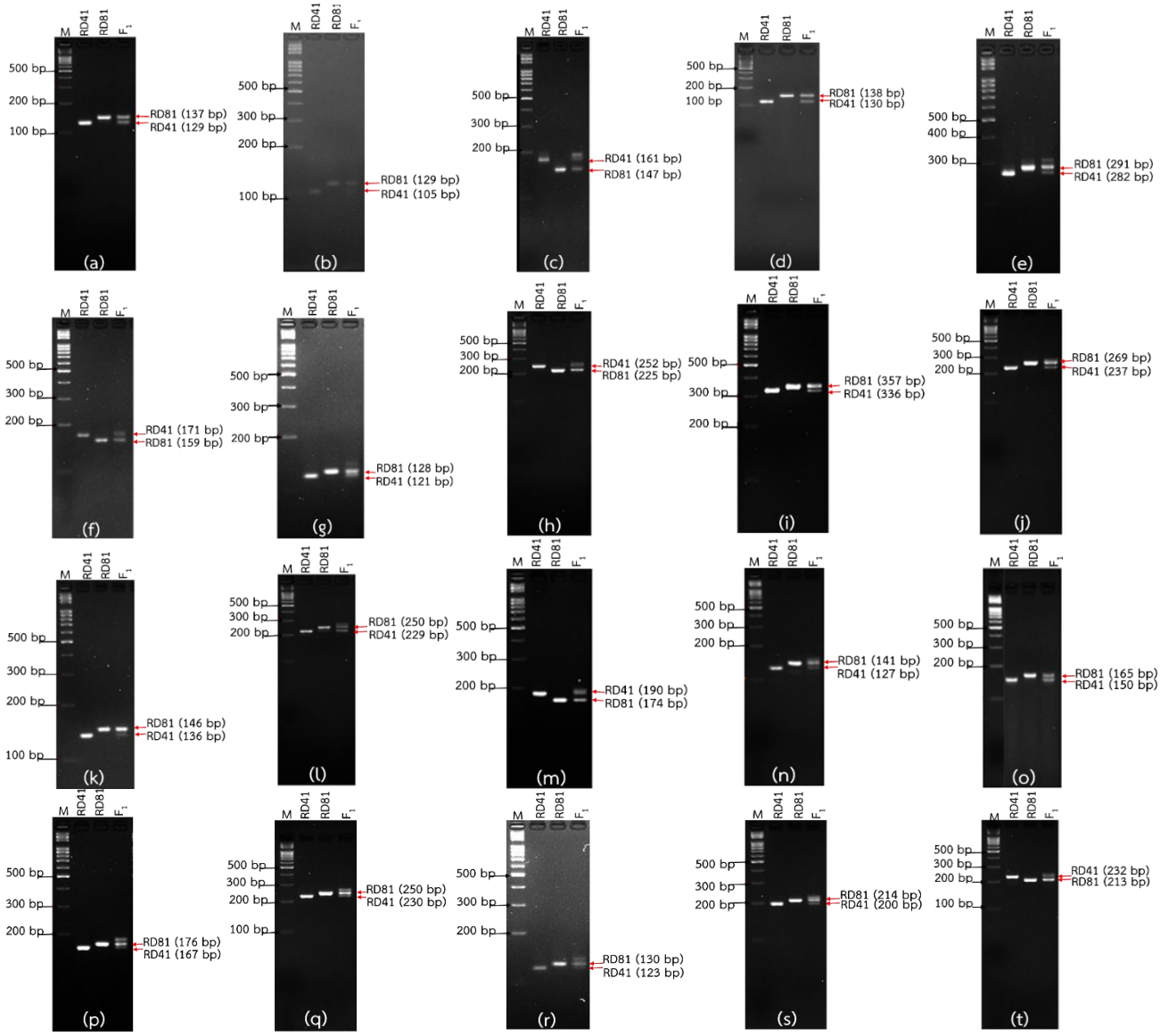
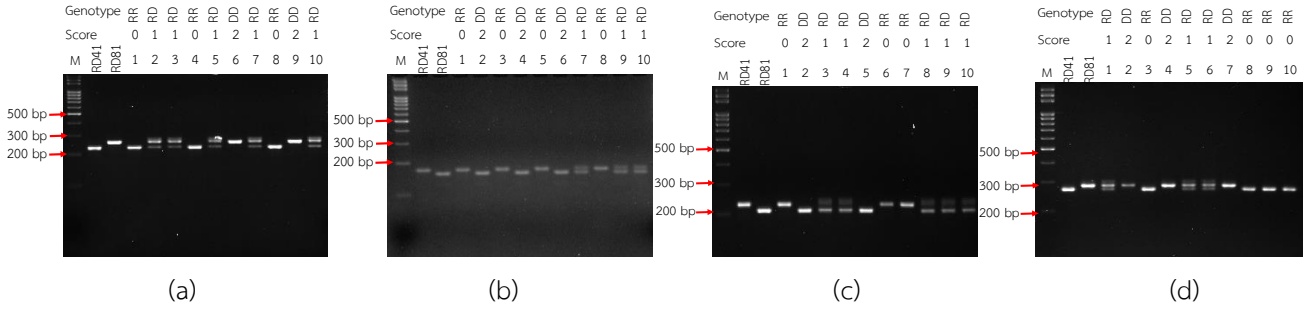


Figure 1 PCR amplified fragments of the 20 molecular markers located at or linked to the genes controlling the grain number per panicle. (a) *APO2*; (b) *NAL1*; (c) *Ghd7*; (d) *FON4*; (e) *LARGE2*; (f) *SMG3*; (g) *MOC1*; (h) *MED25*; (i) *Dep1*; (j) *OsPRR1*; (k) *BG1 ;* (l) *RCN1 ;* (m) *OsSPL7;* (n) *MFS2;* (o) *qGN4-1;* (p) *EBS*; (q) *GSN1;* (r) *Sped1D;* (s) *PAY1* and (t) *SPL18.* Lane M represented a 100 bp DNA ladder.



(a) (b) (c) (d)

Figure 2 PCR-amplified fragments of InDel and SSR markers located or linked to genes controlling grain number per panicle. (a) the OsPRR1 down2 NW-1 markers linked to the *OsPRR1* gene; (b) the SMG3 exon1 NW-2 marker located in the *SMG3* gene; (c) the SPL18 up NW-1 markers linked to the *SPL18* gene; and (d) the RM28082 markers linked to the *LARGE2* gene (an SSR marker). These markers were tested in an F_2 plant population using a 4% agarose gel. Gel lanes 1 to 10 represent different F_2 plant populations, while lane M contained the 100 bp DNA Ladder Plus as a reference marker.

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 และ F_4

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในข้างต้นไปตรวจสอบในประชากรต้น F_2 จำนวน 128 กอ และประชากรต้น F_4 จำนวน 138 กอ จากนั้นนำผลข้อมูลการศึกษาที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 และ F_4 ด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบรายคู่ (least significant difference, LSD) ซึ่งจะถูกจำแนกตามจีโนไทป์ ได้แก่ RR, RD และ DD ซึ่งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีนจำนวน 20 ตำแหน่ง กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1* และ *LAGRE2* กับค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18* กับค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) **(Table 3)** ส่วนในประชากรต้น F_4 พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1, RCN1* และ *SMG3* กับค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *Ghd7, FON4* และ *LARGE2* กับค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (**Table 3**) พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *LARGE2* กับค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความสัมพันธ์กันทางสถิติทั้งในประชากรต้น F_2 และ F_4

Table 3 ANOVA analysis of the relationship between the genotype of molecular markers and the phenotype (grain number per panicle) of the F_2 and F_4 plant populations

No.	Molecular marker of genes	Genotype	Grain number per panicle (n=128)				Grain number per panicle (n=138)			
			F_2 plant population				F_4 plant population			
			Number	Mean	SD	*p*-value	Number	Mean	SD	*p*-value
1	*OsPRR1*	RR	25	224.44^{b}	40.70	0.003 **	51	250.78	54.12	0.122^{ns}
		RD	67	236.67^{b}	36.86		12	248.79	37.86	
		DD	36	259.44^{a}	47.47		75	268.32	50.14	
2	*BG1*	RR	30	232.17	32.88	0.323^{ns}	55	237.43^{b}	44.22	0.000**
		RD	65	240.80	43.75		19	261.02^{ab}	51.47	
		DD	33	248.33	47.19		64	279.40^{a}	49.42	
3	*RCN1*	RR	40	229.45	33.51	0.132^{ns}	81	250.43^{b}	51.06	0.007**
		RD	59	245.27	44.42		13	254.01^{ab}	46.97	
		DD	29	246.48	47.05		44	279.83^{a}	48.01	
4	*SMG3*	RR	36	228.64	38.13	0.096^{ns}	102	249.42^{b}	45.79	0.000**
		RD	63	242.81	38.65		10	294.57^{a}	51.02	
		DD	29	250.66	51.96		26	288.94^{a}	56.21	
5	*OsSPL7*	RR	28	231.71	44.02	0.457^{ns}	73	254.55	52.54	0.092^{ns}
		RD	78	243.10	43.55		19	249.55	42.70	
		DD	22	243.05	35.41		46	273.39	50.61	
6	*MFS2*	RR	28	231.89	44.02	0.391^{ns}	75	254.90	51.99	0.053^{ns}
		RD	76	241.58	42.69		17	244.85	46.77	
		DD	24	247.67	39.08		46	274.35	49.21	
7	*APO2*	RR	33	240.00	47.24	0.855^{ns}	78	257.68	54.36	0.808^{ns}
		RD	73	242.14	41.74		19	262.01	49.66	
		DD	22	236.41	37.84		41	263.95	46.45	
8	*NAL1*	RR	42	238.17	46.40	0.63^{ns}	74	257.91	49.24	0.850^{ns}
		RD	67	239.72	36.13		20	261.17	49.14	
		DD	19	249.11	53.44		44	263.43	56.15	
9	*qGN4-1*	RR	37	233.84	39.08	0.419^{ns}	77	258.58	49.01	0.809^{ns}
		RD	65	241.52	40.51		16	256.44	51.03	
		DD	26	247.92	50.73		45	264.13	55.71	
10	*EBS*	RR	35	245.00	37.39	0.627^{ns}	74	258.31	47.62	0.214^{ns}
		RD	55	241.33	39.98		16	281.10	65.02	
		DD	38	235.50	49.86		48	255.98	51.00	
11	*GSN1*	RR	26	237.19	45.78	0.743^{ns}	55	253.93	49.23	0.428^{ns}
		RD	65	243.45	43.49		30	259.70	53.15	
		DD	37	238.00	38.36		53	266.83	52.26	
12	*MOC1*	RR	35	248.09	42.71	0.165^{ns}	48	254.78	42.06	0.338^{ns}
		RD	56	242.96	46.53		14	277.77	62.54	
		DD	37	229.95	33.31		76	260.28	54.11	

Table 3 (continued)

No.	Molecular marker of genes	Genotype	Grain number per panicle (n=128)				Grain number per panicle (n=138)			
			F_2 plant population				F_4 plant population			
			Number	Mean	SD	*p*-value	Number	Mean	SD	*p*-value
13	*Sped1D*	RR	35	251.54	42.01		48	257.18	44.78	
		RD	58	241.17	46.12	0.077^{ns}	14	269.53	58.06	0.732^{ns}
		DD	35	228.71	33.03		76	260.28	54.11	
14	*Ghd7*	RR	36	233.50	36.84		63	258.04^{a}	45.6	
		RD	64	242.45	42.78	0.473^{ns}	15	229.34^{b}	35.72	0.019*
		DD	28	245.50	47.92		60	270.05^{a}	57.06	
15	*PAY1*	RR	27	233.33	35.87		70	263.77	46.53	
		RD	70	239.87	44.44	0.386^{ns}	24	254.06	56.37	0.677^{ns}
		DD	31	248.58	42.55		44	257.69	55.98	
16	*MED25*	RR	37	237.22	40.19		67	260.10	53.67	
		RD	59	242.03	47.59	0.849^{ns}	16	260.69	58.41	0.999^{ns}
		DD	32	241.88	34.74		55	260.03	46.76	
17	*Dep1*	RR	31	239.29	43.27		56	266.30	56.89	
		RD	63	244.19	44.67	0.596^{ns}	12	250.96	41.42	0.477^{ns}
		DD	34	235.15	37.22		70	256.79	47.93	
18	*SPL18*	RR	36	256.56^{a}	40.22		45	267.99	52.04	
		RD	61	237.93^{b}	44.56	0.014*	20	264.43	46.14	0.335^{ns}
		DD	31	227.32^{b}	34.97		73	254.13	51.9	
19	*FON4*	RR	29	231.69	45.51		62	250.85^{b}	47.83	
		RD	69	241.09	40.21	0.329^{ns}	12	292.52^{a}	50.51	0.028*
		DD	30	248.10	43.76		64	263.07^{ab}	52.44	
20	*LARGE2*	RR	34	224.56^{b}	34.65		72	250.18^{b}	52.66	
		RD	64	241.23^{ab}	41.28	0.007**	13	290.32^{a}	39.24	0.017*
		DD	30	257.43^{a}	46.69		53	266.28^{ab}	48.63	

**Significance at $p<0.01$, *Significance at $p<0.05$, ^{ns} Non-significance, RR: Homozygous for RD41 alleles, RD: Heterozygous for RD41 and RD81 allele, DD: Homozygous for RD81 allele, n: Number of random samples in the F_2 and F_4 plant populations, SD: Standard deviation. Means with the same letter are not significantly different from each other ($p < 0.01$ ANOVA followed by LSD test).

เมื่อวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากรต้น F_2 และ F_4 เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยวิธี Pearson correlation พบว่า จีโนไทป์ของทุกเครื่องหมายโมเลกุลมีระดับความสัมพันธ์ที่ต่ำถึงต่ำมากกับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ดังนี้ ในประชากรต้น F_2 กับจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1, LARGE2, SMG3* และ *RCN1* มีความสัมพันธ์ในเชิงบวก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 0.293, 0.262, 0.186 และ 0.173 ตามลำดับ ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18* และ *MOC1* มีความสัมพันธ์ในเชิงลบ ซึ่งมีค่า r เท่ากับ -0.251 และ -0.155 ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายที่เหลือไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 ส่วนในประชากรต้น F_4 กับจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1, SMG3, RCN1, OsPRR1, MFS2, OsSPL7* และ *LARGE2* มีความสัมพันธ์ในเชิงบวก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 0.381, 0.331, 0.257, 0.165, 0.163, 0.159 และ 0.157 ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายที่เหลือไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_4 (**Table 4**)

Table 4 Correlation coefficients (r) were calculated using Pearson correlation analysis of the 20 molecular markers located at or linked to the genes and their relationship with grain number per panicle traits in the F_2 and F_4 plant populations

No.	Molecular markers of genes	chr.	Grain number per panicle			
			F_2 plant population (n = 128)		F_4 plant population (n = 138)	
			r	*p*-value	r	*p*-value
1	*OsPRR1*	2	0.293	0.000**	0.165	0.027*
2	*BG1*	3	0.134	0.066ns	0.381	0.000**
3	*RCN1*	3	0.173	0.026*	0.257	0.001**
4	*SMG3*	3	0.186	0.018*	0.331	0.000**
5	*OsSPL7*	4	0.087	0.166ns	0.159	0.031*
6	*MFS2*	4	0.117	0.094ns	0.163	0.028*
7	*APO2*	4	-0.020	0.410ns	0.056	0.259ns
8	*NAL1*	4	0.070	0.218ns	0.049	0.284ns
9	*qGN4-1*	4	0.118	0.094ns	0.047	0.293ns
10	*EBS*	5	-0.110	0.109ns	-0.010	0.454ns
11	*GSN1*	5	-0.002	0.490ns	0.112	0.096ns
12	*MOC1*	6	-0.155	0.041*	0.041	0.316ns
13	*Sped1D*	6	-0.200	0.012ns	0.023	0.392ns
14	*Ghd7*	7	0.104	0.123ns	0.109	0.101ns
15	*PAY1*	8	0.119	0.091ns	-0.058	0.251ns
16	*MED25*	9	0.042	0.319ns	-0.001	0.497ns
17	*Dep1*	9	-0.034	0.351ns	-0.087	0.156ns
18	*SPL18*	9	-0.251	0.002**	-0.125	0.073ns
19	*FON4*	11	0.129	0.074ns	0.113	0.093ns
20	*LARGE2*	12	0.262	0.001**	0.157	0.033*

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

การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายด้วยวิธี Simple regression ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) ในประชากรต้น F_2 และ F_4 ด้วยสมการถดถอย $\hat{y} = a + bx$ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยอย่างง่ายในประชากรต้น F_2 พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1, LARGE2* และ *SPL18* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *Sped1D* และ *SMG3* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งจากค่า a และ b ที่แสดงใน **Table 5** สามารถใช้ทำนายค่าฟีโนไทป์ คือ จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ ได้ดังนี้ จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1* มีค่า a เท่ากับ 221.153 และค่า b เท่ากับ 18.004 ได้สมการทำนาย $(\hat{y})$ = 221.153 + 18.004 *OsPRR1* แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1* ได้อัลลีลจากข้าวพันธุ์ กข81 เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เพิ่มขึ้น 18.004 เมล็ด และจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1* อธิบายความผันแปรของจำนวนเมล็ดต่อรวง (R^2) ได้ 8.56% (**Table 5**) ในทำนองเดียวกัน จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *LARGE2* และ *SMG3* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 16.445 และ 11.177 ตามลำดับ แสดงว่าถ้าได้อัลลีลจากข้าวพันธุ์ กข81 เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เนื่องจาก b มีค่าเป็นบวก โดยจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *LARGE2* และ *SMG3* อธิบายความผันแปรของจำนวนเมล็ดต่อรวง (R^2) ได้ 7.59 และ 3.55% ตามลำดับ (**Table 5**) ในทางตรงกันข้าม จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18* มีค่า a เท่ากับ 254.784 และค่า b

เท่ากับ -14.759 ได้สมการทำนาย คือ $(\hat{y})$ = 254.784 – 14.759 *SPL18* แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18* ได้อัลลีลจากข้าวพันธุ์ กข81 เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ ลดลง 14.759 เมล็ด และจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18* อธิบายความผันแปรของจำนวนเมล็ดต่อรวง (R^2) ได้ 6.40% (**Table 5**) เช่นเดียวกันกับจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *Sped1D* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -11.414 แสดงว่า ถ้าได้อัลลีลจากข้าวพันธุ์ กข81 เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ ลดลงเช่นเดียวกัน เนื่องจาก b มีค่าเป็นลบ โดยจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *Sped1D* อธิบายความผันแปรของจำนวนเมล็ดต่อรวง (R^2) ได้ 4.01% (**Table 5**)

ส่วนผลการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายในประชากรต้น F_4 พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1, RCN1* และ *SMG3* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) กับจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* มีค่า a เท่ากับ 237.812 และค่า b เท่ากับ 20.962 ได้สมการทำนาย $(\hat{y})$ = 237.812 + 20.962 *BG1* แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* ได้อัลลีลจากข้าวพันธุ์ กข81 เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เพิ่มขึ้น 20.962 เมล็ด และจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* อธิบายความผันแปรของจำนวนเมล็ดต่อรวง (R^2) ได้ 14.48% (**Table 5**) ในทำนองเดียวกัน จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *RCN1* และ *SMG3* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 14.359 และ 21.383 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้อัลลีลจากข้าวพันธุ์ กข81 เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เนื่องจาก b มีค่าเป็นบวก และจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *RCN1* และ *SMG3* อธิบายความผันแปรของจำนวนเมล็ดต่อรวง (R^2) ได้ 6.60% และ 10.96% ตามลำดับ (**Table 5**)

Table 5 Simple regression analysis of the relationship between genotype of molecular markers and phenotype (grain number per panicle) of F_2 and F_4 plant populations, with the regression model $\hat{y} = a + bx$

No.	Molecular markers of genes (x)	Grain number per panicle $(\hat{y})$									
		F_2 plant population (n = 128)					F_4 plant population (n = 138)				
		a	b	SE	R^2 (%)	p-value	a	b	SE	R^2 (%)	p-value
1	*OsPRR1*	221.153	18.004	5.262	8.56	0.001**	249.632	8.952	4.593	2.72	0.053ns
2	*BG1*	232.456	8.070	5.327	1.80	0.132ns	237.812	20.962	4.368	14.48	0.000**
3	*RCN1*	232.320	9.061	5.087	2.46	0.077ns	249.632	14.359	4.631	6.60	0.002**
4	*SMG3*	230.036	11.177	5.191	3.55	0.033*	250.534	21.383	5.226	10.96	0.000**
5	*OsSPL7*	234.800	6.086	6.002	0.81	0.313ns	252.941	8.952	4.759	2.54	0.062ns
6	*MFS2*	232.881	7.969	5.857	1.45	0.176ns	252.946	9.110	4.731	2.65	0.056ns
7	*APO2*	241.826	-1.339	5.778	0.04	0.817ns	257.806	3.191	4.914	0.31	0.517ns
8	*NAL1*	236.800	4.640	5.620	0.54	0.411ns	257.968	2.777	4.862	0.24	0.569ns
9	*qGN4-1*	234.111	7.100	5.357	1.38	0.187ns	258.129	2.620	4.797	0.22	0.586ns
10	*EBS*	246.547	-5.899	4.946	1.12	0.235ns	260.583	-0.545	4.750	0.01	0.909ns
11	*GSN1*	240.735	-0.123	5.394	0.00	0.982ns	253.790	6.444	4.916	1.25	0.192ns
12	*MOC1*	249.862	-9.118	4.943	2.63	0.067ns	257.415	2.267	4.722	0.17	0.632ns
13	*Sped1D*	252.016	-11.414	4.976	4.01	0.023*	258.587	1.292	4.724	0.05	0.785ns
14	*Ghd7*	234.802	6.186	5.304	1.07	0.246ns	254.358	5.912	4.608	1.20	0.202ns
15	*PAY1*	232.697	7.665	5.544	1.49	0.169ns	262.830	-3.313	4.913	0.33	0.501ns
16	*MED25*	238.283	2.413	5.118	0.18	0.638ns	260.171	-0.032	4.674	0.00	0.995ns
17	*Dep1*	242.884	-2.230	5.270	0.14	0.673ns	265.261	-4.649	4.588	0.75	0.313ns
18	*SPL18*	254.784	-14.759	5.030	6.40	0.004**	268.620	-7.049	4.812	1.55	0.145ns
19	*FON4*	232.343	8.194	5.484	1.74	0.138ns	253.995	6.059	4.550	1.29	0.185ns
20	*LARGE2*	224.671	16.445	5.111	7.59	0.002**	252.796	8.518	4.589	2.47	0.066ns

**Significance at p<0.01, * indicates significance at p<0.05, ns Non-significance, n: Number of random samples in the F_2 and F_4 plant population, $(\hat{y})$: Grain number per panicle, a: The constant term, b: Regression coefficient, x: Genotype of molecular marker, SE: Standard error, R^2: Coefficient of determination.

จากผลการศึกษาถดถอยอย่างง่าย (simple regression) ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน 20 ตำแหน่ง กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ในประชากรต้น F_2 พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1, LARGE2*, *SPL18*, *Sped1D* และ *SMG3* ส่วนในประชากรต้น F_4 พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1 RCN1* และ *SMG3* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ จึงนำเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้มาวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณด้วยวิธี Multiple regression เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลมากกว่าหนึ่งตำแหน่งกับลักษณะ จำนวนเมล็ดต่อรวง แต่เพื่อไม่ให้เกิดปัญหา multicollinearity เกิดขึ้นเมื่อตัวแปรอิสระมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีความสัมพันธ์ทางสถิติ ซึ่งอาจทำให้การตัดสินใจผิดพลาดได้ จึงใช้การเลือกตัวแปรโดยวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบลำดับขั้น (stepwise regression)

การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) รูปแบบที่ดีที่สุดในวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน ได้แก่ *OsPRR1, LARGE2*, *SPL18*, *Sped1D* และ *SMG3* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1, LARGE2*, *SPL18* และ *SMG3* กับจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และสามารถร่วมกันอธิบายความผันแปรของจำนวนเมล็ดต่อรวงได้ 26.84% โดยที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1* กับจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความสัมพันธ์มากที่สุด ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 20.321 รองลงมา คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18*, *LARGE2* และ *SMG3* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -17.741, 16.950 และ 14.693 ตามลำดับ ได้สมการทำนาย $(\hat{y})$ = 205.123 + 20.321 *OsPRR1*(x_1) - 17.741 *SPL18*(x_2) + 16.950 *LARGE2*(x_3) + 14.693 *SMG3*(x_4) แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 ตำแหน่ง เหมือนข้าวพันธุ์แม่ กข41 คือ RR ทั้ง 4 ตำแหน่ง มีจำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เท่ากับ 205.123 เมล็ด เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18*(x_2), *LARGE2*(x_3) และ *SMG3*(x_4) คงที่ และได้อัลลีลมาจากข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1*(x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เพิ่มขึ้น 20.321 เมล็ด ในทำนองเดียวกัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1*(x_1), *SPL18*(x_2) และ *SMG3*(x_4) คงที่ และได้อัลลีลมาจากข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *LARGE2*(x_3) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เพิ่มขึ้น 16.950 เมล็ด และเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1*(x_1), *SPL18*(x_2) และ *LARGE2*(x_3) คงที่ และได้อัลลีลมาจากข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SMG3*(x_4) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เพิ่มขึ้น 14.693 เมล็ด ในทางกลับกันเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1*(x_1), *LARGE2*(x_3) และ *SMG3*(x_4) คงที่ และได้อัลลีลมาจากข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18*(x_2) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ ลดลง 17.741 เมล็ด (**Table 6**) ดังนั้น ถ้าต้องการเพิ่มจำนวนเมล็ดต่อรวง จะต้องคัดเลือกยีน *OsPRR1, LARGE2* และ *SMG3* ให้มีอัลลีลเหมือนข้าวพันธุ์พ่อ คือ กข81 และคัดเลือกยีน *SPL18* ให้มีอัลลีลเหมือนข้าวพันธุ์แม่ คือ กข41

เมื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน ได้แก่ *BG1, RCN1* และ *SMG3* กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_4 พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* และ *SMG3* กับจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และสามารถร่วมกันอธิบายความผันแปรของจำนวนเมล็ดต่อรวงได้ 20.86% โดยที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* กับจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความสัมพันธ์มากที่สุด ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 20.96 รองลงมา คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SMG3* มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 17.95 ได้สมการทำนาย คือ $(\hat{y})$ = 232.32 + 20.96 *BG1*(x_1) + 17.95 *SMG3*(x_2) แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง เหมือนข้าวพันธุ์แม่ กข41 คือ RR จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เท่ากับ 232.32 เมล็ด เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SMG3*(x_2) คงที่ และได้อัลลีลมาจากข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1*(x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เพิ่มขึ้น 20.96 เมล็ด ในทำนองเดียวกัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1*(x_1) คงที่ และได้อัลลีลมาจากข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SMG3*(x_2) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวง $(\hat{y})$ เพิ่มขึ้น 17.95 เมล็ด (**Table 6**) ดังนั้น ถ้าต้องการเพิ่มจำนวนเมล็ดต่อรวง จะต้องคัดเลือกยีน *BG1* และ *SMG3* ให้มีอัลลีลเหมือนข้าวพันธุ์พ่อ คือ กข81

Table 6 Multiple regression analysis of the molecular markers located at or linked to the genes and their relationship with grain number per panicle in the F_2 and F_4 plant populations

Molecular markers of genes (x)	Populations	Regression models $\hat{y} = b_0+b_1x_1+b_2x_2+\ldots+b_kx_k$	SE	Adjusted R^2	*p*-value
OsPRR1(x_1) *SPL18*(x_2) *LARGE2*(x_3) *SMG3*(x_4)	F_2	$\hat{y}$ = 205.123 + 20.321 *OsPRR1*(x_1) - 17.741 *SPL18*(x_2) + 16.950 *LARGE2*(x_3) + 14.693 *SMG3*(x_4)	9.615	0.2684	0.000**
BG1(x_1) *SMG3*(x_2)	F_4	$\hat{y}$ = 232.32 + 20.96 *BG1*(x_1) + 17.95 *SMG3*(x_2)	6.103	0.2086	0.000**

**indicating significance at $p<0.01$, $\hat{y}$ represented the predicted phenotype (grain number per panicle), b_0 represented the constant term, b represented the regression coefficient, x_1 represented the genotype of the molecular marker of the *OsPRR1* (F_2 population) and *BG1* (F_4 population) gene, x_2 represented the genotype of the molecular marker of the *SPL18* (F_2 population) and *SMG3* (F_4 population) gene, x_3 represented the genotype of the molecular marker of the *LARGE2* (F_2 population) gene, x_4 represented the genotype of the molecular marker of the *SMG3* (F_2 population) gene, SE represented Standard Error, and R^2 represented the coefficient of determination.

วิจารณ์

จำนวนเมล็ดต่อรวงเป็นลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิต จำนวนเมล็ดต่อรวงเป็นลักษณะเชิงปริมาณที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง และมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง (Lu et al., 2022) ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 20 ตำแหน่ง ที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมจำนวนเมล็ดต่อรวงและผลผลิตกับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง (ฟีโนไทป์) ของประชากรต้น F_2 และ F_4 ที่เกิดจากคู่ผสมของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อย และข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก และการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA, Pearson correlation, Simple regression และ Multiple regression ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Multiple regression ในประชากรต้น F_2 พบว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1, SPL18, LARGE2* และ *SMG3* ส่วนในประชากรต้น F_4 พบว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* และ *SMG3* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ($p<0.01$) โดยที่เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1, LARGE2, BG1* และ *SMG3* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ยกเว้นเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18* ที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับจำนวนเมล็ดต่อรวง **(Table 6)** การวิเคราะห์ด้วยวิธี Multiple regression เป็นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระหลายตัวพร้อมกัน ซึ่งสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างตัวแปรอิสระหรือผลกระทบข้ามตัวแปร (epistatic effects) ได้ (Bocianowski, 2012) ด้วยวิธีการเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน (stepwise selection) เป็นวิธีที่ดีที่สุด โดยวิธีนี้จะพิจารณาทั้งตัวแปรเข้าและตัวแปรออก (รัฐพงศ์ และคณะ, 2560)

จากผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Multiple regression ในงานวิจัยนี้พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1* มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 เมื่อเทียบลำดับเบสของยีน *OsPRR1* พบอัลลีลของยีน *OsPRR1* ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อย เกิดการกลายพันธุ์จำนวน 1 ตำแหน่ง ในเอกซอนที่ 6 แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนนี้ในข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก **(Table 2)** สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2020) ที่รายงานว่าอัลลีลของยีน *OsPRR1* ที่เกิดการกลายพันธุ์โดยมีการขาดหายไปของลำดับเบส จำนวน 7 bp ในเอกซอนที่ 1 ไปยับยั้งการทำงานของยีน *OsCCA1* ที่ควบคุมการพัฒนาการแตกกอทำให้ข้าวแตกกอเพิ่มขึ้น แต่ไปทำให้ยีน *OsTB1* (Takeda et al., 2003), *D14* (Arite et al., 2009) และ *IPA1* (Miura et al., 2010) ที่ควบคุมโครงสร้างรวงไม่ทำงาน จึงทำให้การพัฒนาโครงสร้างของรวงลดลง

ซึ่งอาจทำให้จำนวนเมล็ดต่อรวงลดลงได้ เนื่องจากโครงสร้างของรวงนั้นเป็นปัจจัยในการกำหนดจำนวนเมล็ดต่อรวง (Lu et al., 2022) ดังนั้นจึงพบว่าข้าวพันธุ์แม่ กข41 ที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *OsPRR1* มีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อย และข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ในยีนนี้ มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก ถ้าต้องการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประชากรนี้ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก จึงต้องคัดเลือกต้นข้าวให้อยู่ในสภาพ homozygous ของอัลลีลของยีน *OsPRR1* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ซึ่งได้มาจากอัลลีลของข้าวพันธุ์ กข81

จากการวิเคราะห์ Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18* มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *SPL18* ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ไม่พบการกลายพันธุ์ แต่อัลลีลของยีน *SPL18* ของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 พบการกลายพันธุ์แบบ Nonsynonymous ในเอกซอนที่ 3 จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 19,647,655 bp และ 19,647,656 bp มีการแทนที่จากเบส G เป็นเบส T ทั้ง 2 ตำแหน่ง **(Table 2)** ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yuan et al. (2019) ที่รายงานว่าการกลายพันธุ์แบบ frameshift ของยีน *SPL18* ในเอกซอนที่ 2 และ 3 ส่งผลให้ความกว้าง ความหนาของเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อรวง และความยาวรวงลดลง แต่มีการแตกกอเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Bai et al. (2021) ยังรายงานว่าการกลายพันธุ์ในเอกซอน 3 ตำแหน่งที่ 19,647,656 bp จากเบส G เป็นเบส T ในกลุ่มข้าว *Japonica* ทำให้ความยาวรวงสั้นลง และส่งผลให้จำนวนเมล็ดต่อรวงลดลงด้วย ดังนั้น ถ้าคัดเลือกให้ยีน *SPL18* เป็น homozygous ของอัลลีลข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ซึ่งมีการกลายพันธุ์จะทำให้ข้าวมีจำนวนเมล็ดต่อรวงลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ Multiple regression ที่พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18* มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในเชิงลบ ดังนั้น ถ้าต้องการให้ข้าวมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้นต้องคัดเลือกต้นข้าวที่มีอัลลีลของยีน *SPL18* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ให้อยู่ในสภาพ homozygous ของข้าวพันธุ์แม่ กข41

ผลการวิเคราะห์ Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *LARGE2* มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 โดยที่ Huang et al. (2021) รายงานว่ายีน *LARGE2* สร้างโปรตีน *OsUPL2* ซึ่งมีหน้าที่สร้าง HECT-domain E3 ubiquitin ligase ที่ควบคุมขนาดของโครงสร้างรวง และจำนวนเมล็ดต่อรวง การกลายพันธุ์ที่สูญเสียการทำงานของยีน *large2* ส่งผลให้โปรตีนทำงานผิดปกติ ทำให้มีโครงสร้างของรวงใหญ่ขึ้น และมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้เมล็ดและใบมีขนาดใหญ่ขึ้น รวมทั้งมีลำต้นหนาต้านทานการหักล้ม โดยที่ยีน *LARGE2* ทำงานร่วมกับยีน *APO1* และ *APO2* เพื่อควบคุมขนาดโครงสร้างของรวง และจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีน *apo1* และ *apo2* ทำให้มีโครงสร้างของรวง และมีจำนวนเมล็ดต่อรวงลดลง (Ikeda et al., 2005; Ikeda-Kawakatsu et al., 2012) จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของอัลลีลของยีน *LARGE2* ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 เกิดการกลายพันธุ์แบบ Nonsynonymous จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ เอกซอน 1, 2 และ 3 และอัลลีลของยีน *LARGE2* ของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 เกิดการกลายพันธุ์แบบ Nonsynonymous จำนวน 1 ตำแหน่ง ในเอกซอนที่ 2 **(Table 2)** ซึ่งการกลายพันธุ์ในยีนนี้ของข้าวทั้ง 2 พันธุ์น่าจะทำให้มีจำนวนเมล็ดมากขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *APO1* และ *APO2* ในข้าวทั้ง 2 พันธ์ร่วมด้วย พบว่ายีน *APO1* ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 และของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ไม่เกิดการกลายพันธุ์ (ไม่แสดงผล) แต่พบว่าอัลลีลของยีน *APO2* ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อยเกิดการกลายพันธุ์แบบ Nonsynonymous จำนวน 1 ตำแหน่ง ในเอกซอนที่ 2 แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของอัลลีลของยีน *APO2* ของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก **(Table 2)** ดังนั้นถ้าต้องการคัดเลือกให้ข้าวในประชากรนี้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก ต้องคัดเลือกยีน *LARGE2* ซึ่งมีการกลายพันธุ์ และยีน *APO2* ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ ให้เป็น homozygous ของอัลลีลของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 จึงจะได้ข้าวที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้น เนื่องจากอัลลีลของยีน *APO1* ในข้าวทั้ง 2 พันธุ์เหมือนกัน คือไม่มีการกลายพันธุ์จึงไม่จำเป็นต้องคัดเลือก

ในการวิเคราะห์ Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_4 จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของอัลลีลของยีน *BG1* ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 พบว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบ Nonsynonymous จำนวน 1 ตำแหน่ง ในเอกซอนที่ 1 ส่วนอัลลีลของยีน *BG1* ของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีนนี้ **(Table 2)** โดยที่ Liu et al. (2015) รายงานว่าต้นข้าวที่ยีน *BG1* มีการแทรกของ T-DNA และมีการแสดงออกมาก (overexpression) จะมีขนาดเมล็ดใหญ่ขึ้น มีผลทำให้น้ำหนักเมล็ดและผลผลิตเพิ่มขึ้น แต่ต้นข้าวที่มียีน *BG1* ที่มีการแสดงออกน้อย (reduced expression) จะมีขนาดของเมล็ดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lo et al. (2020) ที่รายงานว่าข้าวที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *Rice Big Grain 1 (RBG1)* และมีการแสดงออกมาก จะมีเมล็ดขนาดใหญ่ขึ้น มีความยาวราก ความยาวรวง และ

ก้านดอกที่ยาวเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีผลผลิตเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประชากรนี้ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้นจะต้องคัดเลือกอัลลีลของยีน *BG1* ที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ให้เป็น homozygous ของอัลลีลของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก

การวิเคราะห์ Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SMG3* มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ทั้งในประชากรต้น F_2 และ F_4 จากการเปรียบเทียบลำดับเบสไม่พบการกลายพันธุ์ของอัลลีลของยีน *SMG3* ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อย แต่พบอัลลีลของยีน *SMG3* เกิดการกลายพันธุ์จำนวน 5 ตำแหน่ง ในเอกซอนที่ 1 ในข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li et al. (2022b) ที่รายงานว่ายีน *SMG3* ของข้าวสายพันธุ์ M494 เกิดการกลายพันธุ์โดยมีการแทรกของลำดับเบส จำนวน 60 bp ในเอกซอนที่ 3 ทำให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้น แต่มีขนาดและน้ำหนักของเมล็ดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li et al. (2023) พบว่ายีน *SMG3* และ *DGS1* เป็นเอนไซม์คู่ E2-E3 ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับระบบ Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) ผ่านการส่งสัญญาณของ Brassinosteroid เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *SMG3* และ *DGS1* ทำให้ขนาดและความยาวของเมล็ดลดลง แต่กลับส่งผลให้จำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบลำเบสของอัลลีลของยีน *DGS1* มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นทั้งในข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวพันธุ์พ่อ กข81 (ไม่แสดงผล) ดังนั้นถ้าต้องการให้ข้าวมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้นต้องคัดเลือกต้นข้าวให้อยู่ในสภาพ homozygous ของอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *SMG3* ที่จะได้มาจากข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดเมล็ดต่อรวงมาก

จากงานวิจัยนี้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Multiple regression ในประชากรต้น F_2 พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsPRR1, SPL18, LARGE2* และ *SMG3* และในประชากรต้น F_4 พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ *BG1* และ *SMG3* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับจำนวนเมล็ดต่อรวง (p<0.01) **(Table 6)** พบเพียงเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SMG3* เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงทั้งใน 2 ประชากร ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่เหลือมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉพาะในประชากรใดประชากรหนึ่งเท่านั้น สาเหตุที่พบเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่สัมพันธ์กับฟีโนไทป์ในประชากรต้น F_2 และ F_4 แตกต่างกันอาจมาจากหลายสาเหตุ คือ สาเหตุแรกเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของความแปรผันทางพันธุกรรม ผ่านการตรึงอัลลีลในรุ่นที่สูงขึ้น ประชากร F_2 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากเกิดจากการผสมพันธุ์กันของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน และยังมีการรวมตัวใหม่ของยีน (recombination) ที่เกิดขึ้นแบบสุ่ม เมื่อพัฒนาไปเป็นรุ่นลูกชั่วที่สูงขึ้นโดยผ่านการผสมตัวเอง (selfing) หลายรุ่น ความแปรผันทางพันธุกรรมจะลดลงเนื่องจากอัลลีลบางตัวถูกตรึง (fixation) ให้อยู่ในสภาพ homozygous ซึ่งอาจทำให้เครื่องหมายโมเลกุลของยีนบางยีนที่เคยมีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ในประชากร F_2 หายไป หรือสามารถตรวจพบเครื่องหมายโมเลกุลของยีนใหม่ที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ในประชากรในรุ่นลูกชั่วที่สูงขึ้น (Zhao et al., 2011; Govintharaj et al., 2016; Bian et al., 2024) อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พบเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ใน 2 ประชากรแตกต่างกัน คือ ผลของปฏิกิริยาของยีนเป็นการข่มของยีนต่างตำแหน่ง (epistasis) การทำงานของยีนที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ อาจได้รับผลกระทบจากปฏิกิริยาของยีนเป็นการข่มของยีนต่างตำแหน่ง (Ma et al., 2007) เนื่องจากในประชากร F_2 มี heterozygosity สูงสุด อาจพบยีนที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ที่มีปฏิกิริยาของยีนเป็นการข่มของยีนต่างตำแหน่งกับยีนอื่นๆ ที่ยังมีการแสดงออกอยู่ เมื่อมีการผสมตัวเองของ F_2 จะทำให้ heterozygosity ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อมีการผสมตัวเองถ้ามีการผสมตัวเองมากกว่า 6 ชั่ว (F_6) จึงจะได้สายพันธุ์แท้ ซึ่งยีนส่วนใหญ่อยู่ในสภาพ homozygous หรือถูกตรึง ทำให้ยีนที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์บางตำแหน่งไม่สามารถแสดงผลได้อีกต่อไป (Li et al., 1997; Sakai et al., 2021) อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พบเครื่องหมายโมเลกุลใน 2 ประชากรที่แตกต่างกัน คือ ผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์และสิ่งแวดล้อม (QTL × Environment Interaction) ยีนที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์บางยีนอาจแสดงผลในสภาพแวดล้อมของการปลูกต้น F_2 แต่ไม่แสดงในสภาพแวดล้อมที่ปลูกต้น F_4 เนื่องจากเงื่อนไขสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ความแตกต่างของฤดูกาล ดิน น้ำ หรืออุณหภูมิ ยีนที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์

กับฟีโนไทป์ที่มีอิทธิพลต่ำ (minor QTL) มักมีความอ่อนไหวต่อปัจจัยสิ่งแวดล้อม ทำให้สามารถตรวจพบได้ในบางรุ่นแต่ไม่พบในรุ่นอื่น (Li et al., 2003; Chapman et al., 2003; Liu et al., 2023)

การตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องหมายโมเลกุลว่ามีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์จริงหรือไม่ (validation) ทำได้หลายวิธี จากงานวิจัยนี้เมื่อพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SMG3*, *OsPRR1*, *LARGE2* และ *SPL18* ในประชากรต้น F_2 และเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* และ *SMG3* ในประชากรต้น F_4 มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงแล้ว ขั้นตอนถัดไป คือ การตรวจสอบว่าเครื่องหมายโมเลกุลมีผลต่อฟีโนไทป์จริง (validation) และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากเพื่อเพิ่มผลผลิตของข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง การตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องหมายโมเลกุลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่หาได้จากงานวิจัยนี้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ในประชากรใหม่ที่ไม่ใช่ประชากรเดิม เพื่อตรวจสอบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่หาได้จากงานวิจัยนี้ยังคงมีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ในประชากรใหม่หรือไม่ (Langridge et al. 2001; Collard and Mackill. 2008; Lowe et al., 2011; Lv et al., 2020) อีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องหมายโมเลกุลว่ามีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์โดยใช้สายพันธุ์ Near-isogenic lines (NILs) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีพื้นฐานพันธุกรรมเหมือนกันเกือบทั้งหมดยกเว้นเฉพาะบริเวณที่ตำแหน่งที่เครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่ต้องการศึกษา วิธีนี้ช่วยให้สามารถตรวจสอบผลของเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่ต้องการศึกษาว่าสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ได้โดยตรง (Wang et al., 2019) การพัฒนาสายพันธุ์ NILs ทำโดยการผสมกลับหลายครั้ง และในแต่ละครั้งของการผสมกลับให้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่สัมพันธ์กับฟีโนไทป์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ช่วยในการคัดเลือกให้อยู่ในสภาพ heterozygous ทำการผสมกลับจนได้พันธุกรรมที่ต้องการแล้วทำการผสมตัวเอง และคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลต่อจนได้สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมเหมือนกันหมดยกเว้นตำแหน่งที่เครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่ต้องการศึกษา และนำสายพันธุ์ที่มีตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่ต้องการศึกษาอยู่ในสภาพ homozygous ของอัลลีลที่ต้องการ มาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่มีอัลลีลที่ต้องการในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่ใช้คัดเลือกมีผลจริง ฟีโนไทป์ของสายพันธุ์ที่มีอัลลีลที่ต้องการกับสายพันธุ์ที่ไม่มีอัลลีลที่ต้องการจะต้องมีฟีโนไทป์แตกต่างกัน (Van Berloo et al., 2000; Sandhu et al., 2019; Hechanova et al., 2021)

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรต้น F_2 และ F_4 ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อย และของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก เริ่มจากศึกษาข้อมูลจากบทความวิจัยเพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมจำนวนเมล็ดต่อรวงและผลผลิต พบยีนที่เกี่ยวข้องจำนวน 98 ตำแหน่ง ต่อจากนั้นส่งจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ไปอ่านลำดับเบสทั้งจีโนม (WGS) แล้วนำลำดับเบสในรหัสของยีน (exon) ทั้ง 98 ตำแหน่งของข้าวทั้ง 2 พันธุ์มาเปรียบเทียบกัน พบว่าข้าวทั้ง 2 พันธุ์มียีนจำนวน 20 ตำแหน่ง ที่มีลำดับเบสในรหัสมีความแตกต่างกันซึ่งทำให้โปรตีนในข้าวทั้ง 2 พันธุ์แตกต่างกันด้วย จากนั้นทำการค้นหาและออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ และเก็บข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากรต้น F_2 และ F_4 แล้วนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี Multiple regression จากงานวิจัยนี้สามารถหาเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่สัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงได้โดยไม่จำเป็นต้องสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม ดังนั้นวิธีการที่ใช้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่สัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในงานวิจัยนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้ระยะเวลาสั้น และประหยัดงบประมาณ เครื่องหมายโมเลกุลที่หาได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้คัดเลือกร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบมาตรฐานเพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประชากรนี้ให้มีเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้นได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี Quantitative trait loci mapping (QTL mapping) ที่เป็นวิธีตรวจหาตำแหน่งของ QTLs ได้ถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำนวนมากในการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม จึงต้องใช้งบประมาณในการดำเนินงานสูง และใช้ระยะเวลานานในการศึกษา (อลิสา, 2554; ปติรุจ และอรอุมา, 2563) และการวิเคราะห์ด้วยวิธี Quantitative trait loci sequencing (QTL-seq) ซึ่งเป็นวิธี

สมัยใหม่ และต้องใช้เทคโนโลยีที่ทันสมัยในการประมวลผล จึงจำเป็นต้องมีอุปกรณ์และผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้าน เพื่อศึกษาข้อมูล (สามารถ, 2563; Takagi et al., 2013)

เนื่องจากประชากรต้น F_4 ที่มีอัตราความคงตัวทางพันธุกรรมเท่ากับ 87.50% (กฤษฎา, 2528) ซึ่งจำนวนยีนของประชากรต้น F_4 ค่อนข้างจะเข้าสู่สภาพ homozygous ที่ใกล้เคียงกับของสายพันธุ์แท้ ในงานวิจัยนี้จึงประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* และ *SMG3* คัดเลือกต้น F_4 ที่มียีนทั้ง 2 ตำแหน่งเป็น homozygous ของอัลลัลของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 โดยคัดเลือกกอที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก และมีเมล็ดยาว นำเมล็ด F_5 ที่คัดเลือกได้นี้ไปปลูกในแปลงนาทดลองและนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวจะคัดเลือกสายพันธุ์และต้น F_5 ที่มีลักษณะการเกษตรที่ดี ต่อจากนั้นนำเมล็ด F_6 ที่คัดเลือกได้ไปปลูกศึกษาพันธุ์ขั้นต้น (2 row observation) ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวและต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรดีไปปลูกศึกษาพันธุ์ขั้นสูง (4 row observation) ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะการเกษตรดีไปปลูกเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี (intra-station yield trial) เปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี (inter-station yield trial) ทดสอบผลผลิตในนาเกษตรกร (farmer yield trial or On-farm trial) (กองวิจัยและพัฒนากรมการข้าว, 2559) และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีไปขอจดทะเบียนคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ ตามพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 จากกรมวิชาการเกษตร (สำนักงานพัฒนารัฐบาลดิจิทัล (องค์การมหาชน), 2565) ต่อจากนั้นทำการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวเพื่อเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป

สรุป

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อย ข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก และประชากรต้น F_2 และ F_4 ด้วยวิธี ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่แบบ LSD พบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ข้าวพันธุ์พ่อ กข81 และประชากรต้น F_2 เท่ากับ 200.00±21.96, 283.40±28.00 และ 240.60±42.32 เมล็ด ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ข้าวพันธุ์พ่อ กข81 และประชากรต้น F_4 เท่ากับ 159.24±12.30, 302.30±38.21 และ 260.12±51.21 เมล็ด ตามลำดับ เมื่อใช้เทคโนโลยีในการอ่านลำดับเบสทั้งจีโนม (WGS) ช่วยวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์และอินเดลของข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ที่แตกต่างกันในรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงและผลผลิต จำนวน 98 ตำแหน่ง พบว่ามียีน 20 ตำแหน่ง ที่มีสนิปส์และอินเดลเกิดขึ้นในรหัสของยีน ซึ่งมีผลทำให้กรดอะมิโนที่สร้างจากยีนนั้นๆ แตกต่างกันในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ ได้แก่ ยีน *OsPRR1, BG1, RCN1, SMG3, OsSPL7, MFS2, APO2, NAL1, qGN4-1, EBS, GSN1, MOC1, Sped1D, Ghd7, PAY1, MED25, Dep1, SPL18, FON4* และ *LARGE2* มีการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันชัดเจนระหว่างข้าวทั้ง 2 พันธุ์ และสามารถใช้ตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้ชัดเจน นำเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้มาตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากรต้น F_2 และ F_4 และปลูกประชากรต้น F_2 และ F_4 เพื่อเก็บข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Simple regression พบว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1, SMG3, Sped1D, SPL18* และ *LARGE2* ในประชากรต้น F_2 และจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1, RNC1* และ *SMG3* ในประชากรต้น F_4 กับจำนวนเมล็ดต่อรวงมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Multiple regression เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลมากกว่าหนึ่งตำแหน่งกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ด้วยการเลือกตัวแปรโดยวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน ในประชากรต้น F_2 พบรูปแบบที่ดีที่สุด คือ เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *OsPRR1, SMG3, SPL18* และ *LARGE2* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับจำนวนเมล็ดต่อรวง (p<0.01) ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรได้ (R-squared; R^2) 26.84% และในประชากรต้น F_4 พบรูปแบบที่ดีที่สุด คือ เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *BG1* และ *SMG3* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับจำนวนเมล็ดต่อรวง (p<0.01) ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรได้ 20.86% เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (b) ในสมการถดถอยพหุคูณ พบเครื่องหมายโมเลกุลของยีน จำนวน 4 ตำแหน่ง คือ *OsPRR1, BG1, SMG3* และ *LARGE2* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ดังนั้นถ้าต้องการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประชากรนี้ให้มีเมล็ดต่อร่วงมากจะต้องคัดเลือกอัลลีลให้เป็น homozygous ของอัลลีลของข้าวพันธุ์พ่อ กข81 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *SPL18* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ดังนั้นต้องคัดเลือกอัลลีลของยีน *SPL18* ให้เป็น homozygous ของอัลลีลของข้าว

พันธุ์แม่ กข41 จึงทำให้ข้าวมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้น การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในงานวิจัยนี้ ประหยัดทั้งงบประมาณ และเวลา โดยที่เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้เหล่านี้สามารถใช้คัดเลือกร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบมาตรฐาน เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประชากรนี้ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากขึ้น เพื่อให้ได้ข้าวสายพันธุ์ใหม่ที่มีผลผลิตสูงต่อไป ถึงอย่างไรก็ตามถ้าต้องการให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงที่ถูกต้องและแม่นยำ จำเป็นจะต้องมีการตรวจสอบยืนยันผล ซึ่งจะทำให้สามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณหน่วยความเป็นศูนย์ปรับปรุงพันธุ์ข้าว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อำนวยสถานที่แปลงนาทดลอง ห้องแลปวิจัย อุปกรณ์และสารเคมีในการทำการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และกรมการข้าวที่อนุเคราะห์พันธุ์ข้าวสำหรับใช้ในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

กองวิจัยและพัฒนากรมการข้าว. 2559. พันธุ์ข้าว. แหล่งข้อมูล: https://newwebs2.ricethailand.go.th/webmain/rkb3/ Varieties.htm. ค้นเมื่อ 25 มีนาคม 2567.

ปติรุจ จิรกาลวงศ์ และอรอุมา ตนะดุลย. 2020. การค้นหาตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมปริมาณเส้นใยและความยาวฝักถั่วฝักยาวด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SNP. วารสารแก่นเกษตร. 48: 461–470.

ประจักษ์ เหล็งบำรุง, กิตติมา รักโสภา, เจริญ ทองระย้า, วันชัย โรจนหัสดิน และอัญชลี ประเสริฐศักดิ์. 2556. อิทธิพลของสภาพแวดล้อมต่อความแปรปรวนของลักษณะประจำพันธุ์ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง. ม.ป.ท: กรมการข้าว สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี.

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2526. กำเนิดของทฤษฎีพันธุศาสตร์ประชากร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

รัฐพงศ์ ชัยเอิก, ปริม ชูคากร และวรรณพร จันโทภาส. 2560. วิธีการคัดเลือกตัวแปรในการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ Variable Selection in Multiple Linear Regression Analysis. แหล่งข้อมูล: https://sc2.kku.ac.th/stat/statweb/ images/ Eventpic/60/Seminar/01 11 pdf. ค้นเมื่อ 5 มกราคม 2568.

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์กรมหาชน). 2567. ปัจจัยด้านพันธุกรรมหรือพันธุ์. แหล่งข้อมูล: https://research.hrdi.or.th/ public/upload/z7dvj97u6e.pdf. ค้นเมื่อ 21 ธันวาคม 2567.

สามารถ วันชะนะ. 2563. การค้นหา QTLs ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคเมล็ดด่างและโรคใบขีดโปร่งแสงในข้าวอย่างรวดเร็วด้วยวิธีการ QTL-seq และ GWAS ร่วมกับการค้นหาลำดับเบสดีเอ็นเอทั้งจีโนม. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สำนักงานพัฒนารัฐบาลดิจิทัล (องค์การมหาชน). 2565. การจดทะเบียนคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ ตามพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542. แหล่งข้อมูล: https://info.go.th/procedure/94e56d18-4527-41bf-8648-488971746f7a/ view?lat=&lng=. ค้นเมื่อ 25 กุมภาพันธ์ 2568.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. เนื้อที่ใช้ประโยชน์ทางการเกษตร รายจังหวัด ปี พ.ศ. 2562. แหล่งข้อมูล: https://www.oae.go.th/assets/ portals/1/files/socio/LandUtilization2562.pdf. ค้นเมื่อ 3 พฤศจิกายน 2567.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2566. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2567. แหล่งข้อมูล: https://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/jounal/2566/trend2567.pdf. ค้นเมื่อ 3 พฤศจิกายน 2567.

สุภมาส อังศุโชติ. 2556. การวิเคราะห์ข้อมูลวิจัยเพื่อพัฒนาการเรียนการสอน. เจริญดีมั่นคงการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

อลิสา คงใจมั่น. 2554. การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในประชากรลูกผสมชั่วที่สองของถั่วพุ่มป่า The QTL analysis of hard-seededness in wild cowpea using F_2 population. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อัทธ์ พิศาลวานิช. 2554. การเปรียบเทียบศักยภาพการผลิตและการค้าข้าวไทยและเวียดนามในตลาดอาเซียน. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 31: 158-170.

Arite, T., M. Umehara, S. Ishikawa, A. Hanada, M. Maekawa, S. Yamaguchi, and J. Kyozuka. 2009. *d14*, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. Plant and Cell Physiology. 50: 1416-1424.

Ashikari, M., H. Sakakibara, S. Lin, T. Yamamoto, T. Takashi, A. Nishimura, A. Enrique, R. Qian, Q. Qian, H. Kitano, and M. Matsuoka. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. Science. 309: 741-745.

Bai, S., J. Hong, L. Li, S. Su, Z. Li, W. Wang, F. Zhang, W. Liang, and D. Zhang. 2021. Dissection of the genetic basis of rice panicle architecture using a genome-wide association study. Rice. 14: 1-12.

Bian, Z., D. Cao, Y. Zou, D. Xie, W. Zhuang, Z. Sun, N. Mou, Y. Sun, C. Zhang, Q. Li, Q. Liu, and L. Zhang. 2024. Genetic dissection of major rice QTLs for strong culms and fine mapping of qWS5 for breeding application in transplanted system. Rice. 17: article ID 43.

Bocianowski, J. 2012. The use of weighted multiple linear regression to estimate QTL-by-QTL epistatic effects. Genetics and Molecular Biology. 35: 802-809.

Callis, J. 2014. The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. The Arabidopsis Book. 12: article ID e0174.

Chapman, A., V. R. Pantalone, A. Ustun, F. L. Allen, D. Landau-Ellis, R. N. Trigiano, and P. M. Gresshoff. 2003. Quantitative trait loci for agronomic and seed quality traits in an F_2 and $F_{4:6}$ soybean population. Euphytica. 129: 387-393.

Chu, H., Q. Qian, W. Liang, C. Yin, H. Tan, X. Yao, Z. Yuan, J. Yang, H. Huang, and D. Zhang. 2006. The floral organ number4 gene encoding a putative ortholog of Arabidopsis CLAVATA3 regulates apical meristem size in rice. Plant Physiology. 142: 1039-1052.

Collard, B. C., and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 363: 557-572.

Collard, B. C., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica. 142: 169-196.

Dai, Z., J. Wang, X. Yang, H. Lu, X. Miao, and Z. Shi. 2018. Modulation of plant architecture by the *miR156f–OsSPL7–OsGH3*. 8 pathway in rice. Journal of Experimental Botany. 69: 5117-5130.

Deveshwar, P., A. Prusty, S. Sharma, and A. K. Tyagi. 2020. Phytohormone-mediated molecular mechanisms involving multiple genes and QTL govern grain number in rice. Frontiers in Genetics. 11: article ID 586462.

Dong, X., X. Wang, L. Zhang, Z. Yang, X. Xin, S. Wu, C. Sun, J. Liu, J. Yang, and X. Luo. 2013. Identification and characterization of *OsEBS*, a gene involved in enhanced plant biomass and spikelet number in rice. Plant Biotechnology Journal. 11: 1044-1057.

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: 133-139.

Gao, X., W. Liang, C. Yin, S. Ji, H. Wang, X. Su, C. Guo, H. Kong, H. Xue, and D. Zhang. 2010. The *SEPALLATA*-like gene *OsMADS34* is required for rice inflorescence and spikelet development. Plant Physiology. 153: 728-740.

Gouda, G., M. K. Gupta, R. Donde, J. Kumar, M. Parida, T. Mohapatra, S. K Dash, S. K. Pradhan, and L. Behera. 2020. Characterization of haplotypes and single nucleotide polymorphisms associated with *Gn1a* for high grain number formation in rice plant. Genomics. 112: 2647-2657.

Govintharaj, P., T. Shalini, S. Manonmani, and S. Robin. 2016. Estimates of genetic variability, heritability and genetic advance for blast resistance gene introgressed segregating population in rice. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 5: 672-677.

Guo, T., K. Chen, N. Q. Dong, C. L. Shi, W. W. Ye, J. P. Gao, J. X. Shan, and H. X. Lin. 2018. *GRAIN SIZE AND NUMBER1* negatively regulates the OsMKKK10-OsMKK4-OsMPK6 cascade to coordinate the trade-off between grain number per panicle and grain size in rice. The Plant Cell. 30: 871-888.

Hechanova, S. L., K. Bhattarai, E. V. Simon, G. Clave, P. Karunarathne, E. K. Ahn, C. P. Li, J. S. Lee, A. Kohli, N. R. S. Hamilton, J. E. Hernandez, G. B. Gregorio, K. K. Jena, G. An, and S. R. Kim. 2021. Development of a genome-wide InDel marker set for allele discrimination between rice *(Oryza sativa)* and the other seven AA-genome *Oryza* species. Scientific Reports. 11: article ID 8962.

Huang, L., K. Hua, R. Xu, D. Zeng, R. Wang, G. Dong, G. Zhang, L. Xueli, N. Fang, and Y. Li. 2021. The *LARGE2-APO1/APO2* regulatory module controls panicle size and grain number in rice. The Plant Cell. 33: 1212-1228.

Huang, X., Q. Qian, Z. Liu, H. Sun, S. He, D. Luo, G. Xia, C. Chu, J. Li, and X. Fu. 2009. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. Nature Genetics. 41: 494-497.

Huang, Y., S. Zhao, Y. Fu, H. Sun, X. Ma, L. Tan, F. Liu, X. Sun, H. Sun, P. Gu, D. Xie, C. Sun, and Z. Zhu. 2018. Variation in the regulatory region of FZP causes increases in secondary inflorescence branching and grain yield in rice domestication. The Plant Journal. 96: 716-733.

Huangfu, L., R. Chen, Y. Lu, E. Zhang, J. Miao, Z. Zuo, Y. Zhao, M. Zhu, Z. Zhang, P. Li, Y. Xu, Y. Yao, G. Liang, C. Xu, and Z. Yang. 2022. *OsCOMT*, encoding a caffeic acid O-methyltransferase in melatonin biosynthesis, increases rice grain yield through dual regulation of leaf senescence and vascular development. Plant Biotechnology Journal. 20: 1122-1139.

Ikeda, K., N. Nagasawa, and Y. Nagato. 2005. *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1* temporally regulates meristem identity in rice. Developmental Biology. 282: 349-360.

Ikeda-Kawakatsu, K., M. Maekawa, T. Izawa, J. I. Itoh, and Y. Nagato. 2012. *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 2/RFL*, the rice ortholog of Arabidopsis *LEAFY*, suppresses the transition from inflorescence meristem to floral meristem through interaction with *APO1*. The Plant Journal. 69: 168-180.

International Rice Genome Sequencing Project and T. Sasaki, 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature. 436: 793-800.

Ito, S. 2019. Contemporary global Rice economies: structural changes of Rice production/consumption and trade. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 65: S23-S25.

Jiang, G., Y. Xiang, J. Zhao, D. Yin, X. Zhao, L. Zhu, and W. Zhai. 2014. Regulation of inflorescence branch development in rice through a novel pathway involving the pentatricopeptide repeat protein sped1-D. Genetics. 197: 1395-1407.

Jiao, Y., Y. Wang, D. Xue, J. Wang, M. Yan, G. Liu, G. Dong, D. Zeng, Z. Lu, and J. Li. 2010. Regulation of *OsSPL14* by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. Nature Genetics. 42: 541-544.

Kurakawa, T., N. Ueda, M. Maekawa, K. Kobayashi, M. Kojima, Y. Nagato, H. Sakakibara, and J. Kyozuka. 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. Nature. 445: 652-655.

Langridge, P., E. S. Lagudah, T. A. Holton, R. Appels, P. J. Sharp, and K. J. Chalmers. 2001. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. Australian Journal of Agricultural Research. 52: 1043-1077.

Li, G., H. Zhang, J. Li, Z. Zhang, and Z. Li. 2021. Genetic control of panicle architecture in rice. The Crop Journal. 9: 590-597.

Li, G., B. Xu, Y. Zhang, Y. Xu, N. U. Khan, J. Xie, X. Sun, H. Guo, Z. Wu, X. Wang, H. Zhang, J. Li, J. Xu, W. Wang, Z. Zhang, and Z. Li. 2022a. *RGN1* controls grain number and shapes panicle architecture in rice. Plant Biotechnology Journal. 20: 158-167.

Li, J., B. Zhang, P. Duan, L. Yan, H. Yu, L. Zhang, N. Li, L. Zheng, T. Chai, R. Xu, and Y. Li. 2023. An endoplasmic reticulum-associated degradation–related E2–E3 enzyme pair controls grain size and weight through the brassinosteroid signaling pathway in rice. The Plant Cell. 35: 1076-1091.

Li, R., Z. Li, J. Ye, Y. Yang, J. Ye, S. Xu, J. Liu, X. Yuan, Y. Wang, M. Zhang, H. Yu, Q. Xu, S. Wang, Y. Yang, S. Wang, X. Wei, and Y. Feng. 2022b. Identification of *SMG3*, a QTL coordinately controls grain size, grain number per panicle, and grain weight in rice. Frontiers in Plant Science. 13: article ID 880919.

Li, S., Q. Qian, M. Fu, L. Zeng, B. Meng, J. Kyozuka, M. Maekawa, X. Zhu, J. Zhang, J. Li, and Y. Wang. 2009. *Short panicle1* encodes a putative PTR family transporter and determines rice panicle size. Plant Journal. 58: 592–605.

Li, Y. F., X. Q. Zeng, Y. Li, L. Wang, H. Zhuang, Y. Wang, J. Tang, H. L. Wang, M. Xiong, and G. H. He. 2020. *MULTI-FLORET SPIKELET 2*, a MYB transcription factor, determines spikelet meristem fate and floral organ identity in rice. Plant Physiology. 184: 988-1003.

Li, Z., S.R. Pinson, W.D. Park, A.H. Paterson, and J.W. Stansel. 1997. Epistasis for three grain yield components in rice (*Oryza sativa* L.). Genetics. 145: 453-465.

Li, Z. K., S. B. Yu, H. R. Lafitte, N. Huang, B. Courtois, S. Hittalmani, C. H. M. Vijayakumar, G. F. Liu, G. C. Wang, H. E. Shashidhar, J. Y. Zhuang, K. L. Zheng, V. P. Singh, J. S. Sidhu, S. Srivantaneeyakul, and G. S. Khush. 2003. QTL× environment interactions in rice. I. Heading date and plant height. Theoretical and Applied Genetics. 108: 141-153.

Lin, L., M. Du, S. Li, C. Sun, F. Wu, L. Deng, Q. Chen, and C. Li. 2022. Mediator complex subunit *MED25* physically interacts with DST to regulate spikelet number in rice. Journal of Integrative Plant Biology. 64: 871-883.

Liu, J., A. Jiang, R. Ma, W. Gao, P. Tan, X., Li, C. Du, J. Zhang, X. Zhang, L. Zhang, X. Fang, Z. Yi, and J. Zhang. 2023. QTL mapping for seed quality traits under multiple environments in soybean (*Glycine max* L.). Agronomy. 13: article ID 2382.

Liu, L., H. Tong, Y. Xiao, R. Che, F. Xu, B. Hu, C. Liang, J. Chu, J. Li, and C. Chu. 2015. Activation of *Big Grain1* significantly improves grain size by regulating auxin transport in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 112: 11102-11107.

Lo, S. F., M. L. Cheng, Y. I. C. Hsing, Y. S. Chen, K. W. Lee, Y. F. Hong, Y. Hsiao, A. S. Hsiao, P. J. Chen, L. I. Wong, N. C. Chen, C. Reuzeau, T. H. David Ho, and S. M. Yu. 2020. *Rice Big Grain 1* promotes cell division to enhance organ development, stress tolerance and grain yield. Plant Biotechnology Journal. 18: 1969-1983.

Lowe, I., L. Jankuloski, S. Chao, X. Chen, D. See, and J. Dubcovsky. 2011. Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly virulent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics. 123: 143-157.

Lu, Y., M. Chuan, H. Wang, R. Chen, T. Tao, Y. Zhou, Y. Xu, P. Li, Y. Yao, C. Xu, Z. Yang, and Z. Yang. 2022. Genetic and molecular factors in determining grain number per panicle of rice. Frontiers in Plant Science. 13: article ID 964246.

Lv, M., C. Deng, X. Li, X. Zhao, H. Li, Z. Li, Z. Tian, A. Leonard, J. Jaqueth, B. Li, J. Hao, Y. Chang, and J. Ding. 2021. Identification and fine-mapping of RppCML496, a major QTL for resistance to Puccinia polysora in maize. The Plant Genome. 14: article ID e20062.

Ma, X. Q., J. H., Tang, W. T. Teng, J. B. Yan, Y. J. Meng, and J. S. Li. 2007. Epistatic interaction is an important genetic basis of grain yield and its components in maize. Molecular Breeding. 20: 41-51.

Miura, K., M. Ikeda, A. Matsubara, X. J. Song, M. Ito, K. Asano, M. Matsuoka, H. Kitano, and M. Ashikari. 2010. *OsSPL14* promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. Nature Genetics. 42: 545-549.

Muthayya, S., J. D. Sugimoto, S. Montgomery, and G. F. Maberly. 2014. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. Annals of the New York Academy of Sciences. 1324: 7-14.

Ren, D., Q. Xu, Z. Qiu, Y. Cui, T. Zhou, D. Zeng, L. Guo, and Q. Qian. 2019. *FON4* prevents the multi-floret spikelet in rice. Plant Biotechnology Journal. 17: article ID 1007.

Sakai, T., A. Abe, M. Shimizu, and R. Terauchi. 2021. RIL-StEp: epistasis analysis of rice recombinant inbred lines reveals candidate interacting genes that control seed hull color and leaf chlorophyll content. G3. 11: article ID jkab130.

Sandhu, N., S. Dixit, B. P. M. Swamy, A. Raman, S. Kumar, S. P. Singh, R. B. Yadaw, O. N. Singh, J. N. Reddy, A. Anandan, S. Yadav, C. Venkataeshwarllu, A. Henry, S. Verulkar, N. P. Mandal, T. Ram, J. Badri, P. Vikram, and A. Kumar. 2019. Marker assisted breeding to develop multiple stress tolerant varieties for flood and drought prone areas. Rice. 12: 1-16.

Tabuchi, H., Y. Zhang, S. Hattori, M. Omae, S. Shimizu-Sato, T. Oikawa, Q. Qian, M. Nishimura, H. Kitano, H. Xie, X. Fang, H. Yoshida, J. Kyozuka, F. Chen, and Y. Sato. 2011. *LAX PANICLE2* of rice encodes a novel nuclear protein and regulates the formation of axillary meristems. The Plant Cell. 23: 3276-3287.

Takagi, H., A. Abe, K. Yoshida, S. Kosugi, S. Natsume, C. Mitsuoka, A. Uemura, H. Utsushi, M. Tamiru, S. Takuno, H. Innan, L. M. Cano, S. Kamoun, and R. Terauchi. 2013. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. The Plant Journal. 74: 174-183.

Takeda, T., Y. Suwa, M. Suzuki, H. Kitano, M. Ueguchi-Tanaka, M. Ashikari, M. Matsuoka, and C. Ueguchi. 2003. The *OsTB1* gene negatively regulates lateral branching in rice. The Plant Journal. 33: 513-520.

Terao, T., K. Nagata, K. Morino, and T. Hirose. 2010. A gene controlling the number of primary rachis branches also controls the vascular bundle formation and hence is responsible to increase the harvest index and grain yield in rice. Theoretical and Applied Genetics. 120: 875-893.

van Berloo, R. 2000. Use of molecular markers in plant breeding. Ph. D. Dissertation. Wageningen University, Wageningen.

Wang, F., T. Han, Q. Song, W. Ye, X. Song, J. Chu, J. Li, and Z. J. Chen. 2020. The rice circadian clock regulates tiller growth and panicle development through strigolactone signaling and sugar sensing. Plant Cell. 32: 3124-3138.

Wang, T., T. Zou, Z. He, G. Yuan, T. Luo, J. Zhu, Y. Liang, Q. Deng, S. Wang, A. Zheng, H. Liu, L. Wang, P. Li, and S. Li. 2019. *GRAIN LENGTH AND AWN 1* negatively regulates grain size in rice. Journal of Integrative Plant Biology. 61: 1036-1042.

Wang, X., H. Liu, G. Liu, M. S. Mia, K. H. Siddique, and G. Yan. 2019. Phenotypic and genotypic characterization of near-isogenic lines targeting a major 4BL QTL responsible for pre-harvest sprouting in wheat. BMC Plant Biology. 19: 1-10.

Weng, X., L. Wang, J. Wang, Y. Hu, H. Du, C. Xu, Y. Xing, X. Li, J. Xiao, and Q. Zhang. 2014. *Grain number, plant height, and heading date7* is a central regulator of growth, development, and stress response. Plant Physiology. 164: 735-747.

Wu, Y., Y. Wang, X. F. Mi, J. X. Shan, X. M. Li, J. L. Xu, and H. X. Lin. 2016. The QTL *GNP1* encodes GA20ox1, which increases grain number and yield by increasing cytokinin activity in rice panicle meristems. PLoS Genetics. 12: article ID e1006386.

Wu, X., Y. Liang, H. Gao, J. Wang, Y. Zhao, L. Hua, Y. Yuan, A. Wang, Z. Xiaohui, and Y. Wang. 2021. Enhancing rice grain production by manipulating the naturally evolved cis-regulatory element-containing inverted repeat sequence of *OsREM20.* Molecular Plant. 14: 997-1011.

Xing, Y., and Q. Zhang. 2010. Genetic and molecular bases of rice yield. Annual Review of Plant Biology. 61: 421-442.

Xu, R., H. Yu, J. Wang, P. Duan, B. Zhang, J. Li, Y. Li, J. Xu, J. Lyu, N. Li, T. Chai, and Y. Li. 2018. A mitogen-activated protein kinase phosphatase influences grain size and weight in rice. The Plant Journal. 95: 937-946.

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

Yang, Z., Y. Zhou, J. Huang, Y. Hu, E. Zhang, Z. Xie, S. Ma, Y. Gao, S. Song, C. Xu, and G. Liang. 2015. Ancient horizontal transfer of transaldolase-like protein gene and its role in plant vascular development. New Phytologist. 206: 807-816.

Yau, R., and M. Rape. 2016. The increasing complexity of the ubiquitin code. Nature Cell Biology. 18: 579-586.

Yoshida, S. 1981. Fundamentals of rice crop science. The International Rice Research Institute.

Yuan, H., P. Qin, L. Hu, S. Zhan, S. Wang, P. Gao, L. Li, M. Jin, Z. Xu, Q. Gao, A. Du, B. Tu, W. Chen, B. Ma, Y. Wang, and S. Li. 2019. *OsSPL18* controls grain weight and grain number in rice. Journal of Genetics and Genomics. 46: 41-51.

Zhang, Z., J. Li, Z. Tang, X. Sun, H. Zhang, J. Yu, G. Yao, G. Li, H. Guo, J. Li, H. Wu, H. Huang, Y. Xu, Z. Yin, Y. Qi, R. Huang, W. Yang, and Z. Li. 2018. Gnp4/LAX2, a RAWUL protein, interferes with the OsIAA3–OsARF25 interaction to regulate grain length via the auxin signaling pathway in rice. Journal of Experimental Botany. 69: 4723-4737.

Zhang, Z., X. Sun, X. Ma, B. Xu, Y. Zhao, Z. Ma, G. Li, N.U. Khan, Y. Pan, Y. Liang, H. Zhang, J. Li, and Z. Li. 2021. *GNP6*, a novel allele of *MOC1*, regulates panicle and tiller development in rice. The Crop Journal. 9: 57-67.

Zhao, K., C. W. Tung, G. C. Eizenga, M. H. Wright, M. L. Ali, A. H. Price, G. J. Norton, M. R. Islam, A. Reynolds, J. Mezey, A. M. McClung, C. D. Bustamante, and S. R. McCouch. 2011. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in Oryza sativa. Nature Communications. 2: article ID 467.

Zhao, L., L. Tan, Z. Zhu, L. Xiao, D. Xie, and C. Sun. 2015. *PAY 1* improves plant architecture and enhances grain yield in rice. The Plant Journal. 83: 528-536.

Zheng, N., and N. Shabek. 2017. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation. Annual Review of Biochemistry. 86: 129-157.

Zhou, Y., J. Zhu, Z. Li, C. Yi, J. Liu, H. Zhang, S. Tang, M. Gu, and G. Liang. 2009. Deletion in a quantitative trait gene *qPE9-1* associated with panicle erectness improves plant architecture during rice domestication. Genetics. 183: 315-324.

Zhou, Y., Y. Tao, Y. Yuan, Y. Zhang, J. Miao, R. Zhang, C. Yi, Z. Gong, and G. Liang. 2018. Characterisation of a novel quantitative trait locus, *GN4-1*, for grain number and yield in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics. 131: 637-648.