



วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

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



การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับอายุนอกดอกสั้นในประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์ กข41 กับสายพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย (KDML 105-PISD)

Development of DNA markers associated with early heading date in F_2 populations of RD41 rice variety and KDML 105 photoperiod-insensitive, semi-dwarf rice line. (KDML 105-PISD)

อนุชิตา วงศ์ชื่น^{1*}, แสงทอง พงษ์เจริญกิต¹, ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์¹, ยุพเยาว์ คบพิมาย¹,
กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง² และ วรภรณ์ แสงทอง^{1*}

Anuchida Wongchuen^{1*}, Saengtong Pongjaroenkit¹, Chotipa Sakulsingharoj¹,
Yuppayao Kophimai¹, Krisana Lanumteang² 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: อายุนอกดอกของข้าวเป็นลักษณะที่สำคัญทางการเกษตร เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการปรับตัวของข้าวต่อสภาพแวดล้อมและฤดูกาลเพาะปลูก ลักษณะนี้ถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง และได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะความยาวของช่วงแสง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับอายุนอกดอกสั้นในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 กับข้าวสายพันธุ์พ่อ ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย (KDML 105-PISD) โดยอ่านลำดับเบสทั้งจีโนม (whole genome sequencing; WGS) ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD เพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งสโนปส์ (SNPs) และอินเดล (InDel) ที่แตกต่างกันภายในเอ็กซอน (exon) ของยีนในวิธีการควบคุมอายุนอกดอกจำนวน 56 ตำแหน่ง จากนั้นค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 20 ตำแหน่ง ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous ของแอลลีลข้าวพันธุ์แม่ หรือแอลลีลข้าวสายพันธุ์พ่อ และ heterozygous ระหว่างแอลลีลข้าวพันธุ์แม่และแอลลีลข้าวสายพันธุ์พ่อได้ชัดเจน แล้วนำเครื่องหมายดีเอ็นเอไปหาความสัมพันธ์กับอายุนอกดอกสั้นของประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ผลจากการวิเคราะห์ผลการถดถอยเชิงเดี่ยว จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* มีความสัมพันธ์กับอายุนอกดอกสั้นมากที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 36.52% ภายใต้สภาพวันยาว และ 17.88% ภายใต้สภาพวันสั้น และจากการวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับอายุนอกดอก พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* ร่วมกับ *Hd2*, *OsDof12* และ *OsCOL9* มีความสัมพันธ์กับอายุนอกดอกสั้นมากที่สุดมีค่า R^2 เท่ากับ 61.06% ภายใต้สภาพวันยาว ขณะที่ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* ร่วมกับ *Hd6*, *OsCOL9* และ *OsDof12* มีความสัมพันธ์กับอายุนอกดอกสั้นมากที่สุดมีค่า R^2 เท่ากับ 44.54% ภายใต้สภาพวันสั้น ซึ่งสามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวร่วมกับวิธีมาตรฐานในประชากรนี้ให้มีอายุนอกดอกสั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ข้าว; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; อายุนอกดอกสั้น; สภาพวันยาว; สภาพวันสั้น

* Corresponding author: anuchidawongchuen@gmail.com, varapornsang@gmail.com

Received: date; March 21, 2025 Revised: date; June 3, 2025

Accepted: date; June 10, 2025 Published: date; October 15, 2025

ABSTRACT: The heading date of rice is a key trait affecting its adaptation and growing season. It is regulated by multiple genetic loci and influenced by environmental factors, especially photoperiod length. This study aimed to develop DNA markers associated with an early heading date in an F_2 population derived from a cross between the RD41 rice variety and the photoperiod-insensitive, semi-dwarf KDML 105-PISD rice line. Whole genome sequencing (WGS) was performed on the female and male parent rice cultivars to analyze and identify variations in single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertion/deletion (InDel) positions within the exons of genes involved in controlling heading date at 56 loci. A set of 20 gene markers was identified and developed, enabling a clear distinction between the homozygous alleles of either the female or male parent and the heterozygous alleles combining alleles from both parents. DNA markers were subsequently used to establish a correlation with the early heading date of the F_2 population under both NLD and NSD conditions. Through the simple regression analysis, it was observed that the genotypes of DNA markers located at the *RFT1* gene exhibited the highest relationship with the early heading date, achieving the coefficient of determination (R -squared; R^2) value of 36.52% in NLD and 17.88% in NSD. Analyzed by the multiple regression method, between DNA markers and early heading date, it was found that the genotypes of DNA markers of the *RFT1*, *Hd2*, *OsDof12* and *OsCOL9* genes model were related with early heading date, the R^2 value was 61.06% in NLD. While the genotypes of DNA markers of *RFT1*, *Hd6*, *OsCOL9* and *OsDof12* genes model were related to early heading date, the R^2 value was 44.54% in NSD. The identified DNA markers can improve breeding efficiency for early heading rice when combined with conventional methods.

Keywords: rice; DNA markers; early heading date; natural long-day; natural short-day

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เพราะเป็นสินค้าเกษตรส่งออกหลัก และมีพื้นที่เพาะปลูกมากที่สุดในประเทศ ประมาณ 64.08 ล้านไร่ หรือคิดเป็น 43.38% ของพื้นที่เกษตรทั้งหมด (147.73 ล้านไร่) นอกจากนี้ ยังมีครัวเรือนเกษตรกรที่ประกอบอาชีพปลูกข้าว ประมาณ 4.68 ล้านครัวเรือน หรือ 60.62% ของครัวเรือนเกษตรกรทั้งหมด ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของข้าวต่อเศรษฐกิจ และการดำรงชีวิตของเกษตรกรไทย (สำนักงานนโยบาย และยุทธศาสตร์การค้า กระทรวงพาณิชย์, 2567)

ประเทศไทยมีระบบการปลูกข้าวส่วนใหญ่ปีละ 2 ครั้ง ได้แก่ ฤดูนาปรัง (สภาพวันยาว) และฤดูนาปี (สภาพวันสั้น) โดยในพื้นที่ที่มีระบบชลประทาน ชาวนาสามารถปลูกข้าวได้ 2-3 ครั้งต่อปี ในการปลูกข้าวจะเผชิญกับความเสี่ยงจากภัยธรรมชาติหลายรูปแบบ เช่น น้ำท่วมข้าซาก น้ำหลาก และสภาวะแห้งแล้ง ในกรณีที่ไม่สามารถปลูกข้าวนาปีได้ ชาวนาจะปลูกข้าวนาปรังแทน โดยใช้พันธุ์ข้าวอายุสั้นที่สามารถเก็บเกี่ยวได้ไม่เกิน 110 วัน (สุชาติ, 2552) เช่น ข้าวพันธุ์ กข25 สุพรรณบุรี 2 บางแตง ชัยนาท 2 กข29 กข41 กข43 กข61 กข71 กข81 กข95 และ กข107 (กองวิจัย และพัฒนากรมการข้าว, 2559; ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท, 2565; ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท, 2567) ซึ่งสามารถย่นระยะเวลาการทำนา และสามารถให้ผลผลิตได้ดี

อายุวันออกดอก (Heading date) เป็นลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม และฤดูกาลเพาะปลูก การออกดอกของข้าวได้รับอิทธิพลจากปัจจัยภายนอก เช่น ช่วงแสง อุณหภูมิ และธาตุอาหาร โดยเฉพาะช่วงแสงที่เป็นปัจจัยสำคัญ ซึ่งข้าวเป็นพืชที่มีลักษณะตอบสนองต่อช่วงแสงสั้น การออกดอกจึงได้รับการกระตุ้นในสภาวะวันสั้น และถูกยับยั้งในสภาวะวันยาว (Zhou et al., 2021) การตอบสนองต่อช่วงแสงสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ 1) ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง (non-photosensitive) ข้าวจะเข้าสู่ระยะสีพันธุ์ และออกดอกตามอายุ และความสมบูรณ์พันธุ์ โดยช่วงแสงไม่มีอิทธิพลในการกระตุ้นการออกดอก 2) ข้าวไวต่อช่วงแสงอย่างอ่อน (weakly photosensitive) ข้าวจะมีการเจริญเติบโตทางลำต้นในช่วง 30-60 วัน และจะเริ่มสร้างตาดอกก่อนที่จะได้รับช่วงแสงน้อยกว่า 12 ชม. และ 3) ข้าวไวต่อช่วงแสง (photosensitive) ข้าวจะออกดอกเมื่อได้รับช่วงแสงน้อยกว่าช่วงแสงวิกฤต (น้อยกว่า 12 ชม./วัน) (Vergard and Chang, 1985)

เนื่องจากลักษณะอายุวันออกดอกเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci; QTLs) ถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง และถูกควบคุมด้วยหลายกลไกที่มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกัน ในปัจจุบันมีรายงานการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับวันออกดอกในข้าวประมาณ 75 ยีน (Zhou et al., 2021) จากการศึกษพบว่า มียีนจำนวนมากที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมอายุวันออกดอกข้าว โดยปัจจัยสำคัญที่สุดที่มีผลกระทบต่อการออกดอก คือ ช่วงแสง (Photoperiod) ที่เกี่ยวข้องเนื่องกับการรับรู้ความยาวแสงของวัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับ

ไฟโตโครม ที่เป็นแสงสีแดง เกิดจากการถอดรหัสของยีนในข้าว 3 ยีน ได้แก่ ยีน *phytochrome A (OsPhyA)*, *phytochrome B (OsPhyB)* และ *phytochrome C (OsPhyC)* โดยยีน *OsPhyA* มีบทบาทในการยับยั้งการออกดอกภายใต้สภาพวันยาว (long-day condition) แต่ส่งเสริมการออกดอกภายใต้สภาพวันสั้น (short-day condition) ยีน *OsPhyB* ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการออกดอกโดยตรงจากช่วงแสง และ *OsPhyC* มีบทบาทหลักในการควบคุมการออกดอกภายใต้สภาพวันยาว การกลายพันธุ์ *osphyb* และ *osphyc* สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Hd3a* และ *RFT1* ภายใต้สภาพวันยาว (Takano et al., 2005) การกลายพันธุ์คู่ (double mutants) ของ *OsPhyA-OsPhyC*, *OsPhyA-OsPhyB* และ *OsPhyB-OsPhyC* ทำให้ออกดอกเร็วขึ้นอย่างมากเมื่อเทียบกับการกลายพันธุ์เดี่ยวแต่ละยีน (Lee et al., 2016) และการกลายพันธุ์สามยีน (triple mutants: *OsPhyA-OsPhyB-OsPhyC*) มีการออกดอกใกล้เคียงกันทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น นอกจากนี้ยังมียีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงจากระยะการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น เข้าสู่ระยะการสืบพันธุ์ หรือการสร้างช่อดอกของข้าว ได้แก่ ยีน *Heading date 3a (Hd3a)* และยีน *FLOWERING LOCUS T 1 (RFT1)* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างสารฟลอริเจน (florigens) ที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการออกดอกในข้าว โดยยีน *Hd3a* เป็นยีนหลักที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการออกดอกภายใต้สภาพวันสั้น ขณะที่ยีน *RFT1* เป็นยีนหลักที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการออกดอกภายใต้สภาพวันยาว โดยการทำงานร่วมกันของยีนทั้งสองนี้เป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดช่วงเวลาการออกดอกของข้าวในแต่ละสภาพแวดล้อม (Komiya et al., 2008; Tsuji et al., 2008) การค้นพบยีน *Hd3a* เกิดจากการทำแผนที่ QTL โดยใช้ประชากรลูกผสมระหว่างข้าวพันธุ์ Nipponbare ซึ่งไวต่อช่วงแสง และข้าวพันธุ์ Kasalath ซึ่งไม่ไวต่อช่วงแสง พบว่า ยีน *Hd3a* และยีน *RFT1* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 ห่างกันเพียง 11.5 kb ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการทำซ้ำแบบแทนดัม (tandem duplication) และมีการทำงานที่เกี่ยวข้องกัน (Chardon and Damerval, 2005; Komiya et al., 2009; Hagiwara et al., 2009) โดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกัน 91% จึงทำหน้าที่ในการชักนำการออกดอกของข้าวเช่นเดียวกัน (Kojima et al., 2002) ในการศึกษา ยีน *Hd3a* พบว่า ถูกควบคุมโดยยีน *Hd1* ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor; TF) ที่จับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *Hd3a* (Hayama et al., 2003) เมื่อยีน *Hd1* ไม่มีการทำงาน จะทำให้ออกดอกช้าภายใต้สภาพวันสั้น แต่เกิดการออกดอกเร็วภายใต้สภาพวันยาว ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *Hd1* สามารถทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการออกดอก (flowering activator) หรือเป็นตัวยับยั้งการออกดอก (flowering repressor) ขึ้นอยู่กับสภาพช่วงแสง และหากเกิดการกลายพันธุ์เป็นยีนด้อย *hd1* จะกระตุ้นการแสดงออกของยีน *Hd3a* และยีน *RFT1* จะเพิ่มขึ้นภายใต้สภาพวันยาว และลดลงภายใต้สภาพวันสั้น (Komiya et al., 2009) นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *Ehd1* ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *Hd3a* ยีน *RFT1* ยีน *OsMADS14* และยีน *OsMADS15* (Doi et al., 2004) โดยจากการสร้างสายพันธุ์ข้าวด้วยเทคนิค RNAi ในการปิดการแสดงออกของยีน *Ehd1* พบว่า ข้าวออกดอกช้าลง 7 วัน ภายใต้สภาพวันสั้น (Kim et al., 2007) และข้าวออกดอกช้าลง 10 วัน ภายใต้สภาพวันยาว (Ryu et al., 2009)

ยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกที่ทำหน้าที่เป็นทั้งตัวยับยั้ง และตัวกระตุ้นการออกดอกของข้าว ภายใต้สภาพวันยาว และสภาพวันสั้น ได้แก่ ยีน *OsCOL9* อยู่ในกลุ่มยีน *COL* แปลเป็นรหัสโปรตีน CONSTANS (CO) และ CONSTANS-like (COL) หากมีการแสดงออกมากเกินไปจะทำให้ข้าวออกดอกช้าลงทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น โดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *Ehd1*, *RFT1* และ *Hd3a* ในระดับ mRNA (Wei et al., 2010; Liu et al., 2016) ยีน *OsDof12* อยู่ในกลุ่มยีน *Dof* ที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกภายใต้สภาพวันยาว (Huang et al., 2020) แปลรหัสเป็นโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด Dof (DNA binding with one finger) (Wu et al., 2015) หากมีการแสดงออกมากเกินไป จะกระตุ้นการออกดอกของข้าวภายใต้สภาพวันยาว แต่ไม่มีผลภายใต้สภาพวันสั้น (Li et al., 2009) และยีน *Hd6* ถูกแปลเป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ CK2 α -subunit (Yano and Sasaki, 1997; Takahashi et al., 2001) ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการออกดอกของยีน *Hd3a* และ *RFT1* ภายใต้สภาพวันยาว และมีหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการออกดอกภายใต้สภาพวันสั้น (Aryanti et al., 2017) นอกจากนี้ยังมียีน *Hd16 (EL1)*, *ELF3.1*, *OsLFL1*, *OsVIL2*, *OsEMF2b*, *OsHAP5C/D*, *DHD1*, *OsLF* และกลุ่มยีน SET DOMAIN GROUP (SDG) เช่น *SDG708*, *SDG701*, *SDG723*, *SDG724*, *SDG725* และ *SDG728* ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการออกดอก ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น (Hori et al., 2013; Zhao et al., 2012; Yang et al., 2013a; Yang et al., 2013b; Zhu et al., 2018; Itoh et al., 2019; Peng et al., 2007; Peng et al., 2008;

Conrad et al., 2014; Xie et al., 2015; Ng et al., 2007; Jiang et al. 2018; Liu et al. 2016; Liu et al. 2017; Qin et al. 2010; Sun et al. 2012; Sui et al. 2012; Zhang et al., 2019; Zhao et al., 2011; Wei et al., 2010) ส่วนยีน *Ehd2*, *Ehd4*, *OsFKF1* และ *Hd18* (Matsubara et al., 2008; Wu et al., 2008; Han et al. 2015; Li et al., 2018) ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการออกดอกทั้งภายใต้สภาพวันยาวสั้น และสภาพวันสั้น

ยีนหลักที่ทำหน้าที่ยับยั้งการออกดอกของข้าวภายใต้สภาพวันยาวมีอยู่ 3 ยีน ได้แก่ *Hd2* (Heading date 2), *Hd4* หรือ *Ghd7* (Grain yield and heading date 7) และ *Hd5* หรือ *Ghd8* หรือ *DTH8* (Grain yield and heading date 8) โดยยีนเหล่านี้จะยับยั้งการทำงาน หรือการแสดงออกของยีน *Ehd1* ที่เป็นยีนส่งเสริมการทำงานของยีน *Hd3a* และยีน *RFT1* ในสภาพวันยาว (Lin et al., 2000; Wei et al., 2020; Xue et al., 2008) จากการศึกษาใน *OsPRR37* หรือ *Hd2* มีความสามารถในการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อแสงทำให้ข้าวไวต่อช่วงแสง และกำหนดวันออกดอกได้ (Gao et al., 2014; Koo et al., 2013; Murakami et al., 2005; Yan et al., 2013) ซึ่งหากเกิดการกลายพันธุ์เป็น *ospr37* จะลดระดับการแสดงออกของยีน *Ehd1* และยีน *Hd3a* ส่วนยีน *Ghd7* เป็นยีนที่จำเป็นสำหรับช่วงแสงของวัน จึงอาจนำไปสู่การเปลี่ยนบทบาททางชีววิทยาของยีน *Hd1* ในการตอบสนองต่อช่วงแสงที่แตกต่างกัน โดยยีน *Ghd7* เป็นรหัสของโดเมนโปรตีน CCT (CONSTANS, CONSTANS-LIKE และ TOC1) หากกลายพันธุ์จะมีผลต่อวันออกดอกอย่างมีนัยสำคัญ (Xue et al., 2008) โดยหากยีน *Ghd7* และ *Hd1* มีปฏิสัมพันธ์ กับยีน *DTH8* จะแปลรหัสได้โปรตีน HAP3 เป็นหน่วยย่อยในการสร้างโปรตีนคอมเพล็กซ์ ที่สามารถยับยั้งยีน *Ehd1* ได้โดยตรงภายใต้สภาพวันยาว (Cai et al., 2019; Du et al., 2017; Nemoto et al., 2016; Zhu et al., 2017) จากการศึกษา พบว่า ยีน *Hd5* เป็นยีนหลักที่ควบคุมอายุวันออกดอกในข้าวพันธุ์ Kitaibuki และข้าวพันธุ์ Hoshinoyume โดยข้าวพันธุ์ Kitaibuki มียีน *hd5* ที่ไม่ทำงานเนื่องจากเกิดจากการขาดหายไป 19 เบส เช่นเดียวกับข้าวพันธุ์ Hayamasari ส่งผลให้ออกดอกเร็วกว่า ข้าวพันธุ์ Hoshinoyume ที่มียีน *Hd5* ที่ทำงานได้ (Fujino et al., 2013) ภายใต้สภาพวันยาวยับยั้งการแสดงออกของยีน *Ehd1*, *Hd3a* และ *RFT1* (Wei et al., 2010) แต่ภายใต้สภาพวันสั้นยีน *Hd5* ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนเหล่านี้ โดยการสูญเสียการทำงานของยีนด้อย *hd5* เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ข้าวออกดอกเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังมียีนอื่น ๆ ที่เป็นตัวยับยั้งการออกดอกของข้าว ภายใต้สภาพวันยาว ได้แก่ยีน *OsMADS50*, *OsMADS56*, *SDG711*, *OsHAP3D*, *OsHAP3E*, *OsHAP5A* และ *OsHAP5B* (Lee et al., 2004; Ryu et al., 2009; Peng et al., 2007; Peng et al., 2008; Liu et al., 2014; Wei et al., 2010; Li et al., 2016; Zhu et al., 2017)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกภายใต้สภาพวันสั้น นอกจากยีน *Hd1* ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการออกดอกแล้ว ยังมีองค์ประกอบของยีนเชิงควบคุมอื่น ๆ ที่มีบทบาทในการกำหนดช่วงเวลาออกดอกภายใต้สภาพวันสั้น ได้แก่ ยีน *OsMADS51* ซึ่งเป็นโปรตีนประเภท Type I MADS-box (Kim et al., 2007) หากยีนกลายพันธุ์ *osmads51* จะออกดอกช้าลงประมาณ 2 สัปดาห์ ภายใต้สภาพวันสั้น แต่ไม่ส่งผลต่อระยะเวลาออกดอกภายใต้สภาพวันยาว จากการศึกษาพบว่า ข้าวที่มีการแสดงออกมากเกินไปของยีน *OsMADS51* (*OsMADS51* OX plants) จะออกดอกเร็วขึ้นประมาณ 10 วัน เนื่องจากไปเพิ่มการแสดงออกของยีน *Ehd1* ยีน *Hd3a* และยีน *OsMADS14* ภายใต้สภาพวันสั้น (Kim et al., 2007) นอกจากนี้ ยีน *OsMADS51* เป็นตัวกระตุ้นการออกดอกภายใต้สภาพวันสั้น โดยส่งผ่านสัญญาณกระตุ้นการออกดอกผ่านยีน *OsGI* ไปยังยีน *Ehd1* ให้ข้าวสามารถออกดอกได้ (Kim et al., 2007) ส่วนยีน *OsCO3* จัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน CO-like (Griffiths et al., 2003; Kim et al., 2008) ทำหน้าที่ยับยั้งการออกดอกภายใต้สภาพวันสั้นโดยเฉพาะ โดยมีระดับการถอดรหัสสูงขึ้นในช่วงเวลากลางวัน และลดลงในช่วงเวลากลางคืน (Kim et al., 2008) และข้าวที่มีการแสดงออกมากเกินไปของยีน *OsCO3* (*OsCO3* OX plants) จะการออกดอกช้าลงประมาณ 40 วัน เนื่องจากไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *Hd3a*, *FTL* และ *OsMADS14* ภายใต้สภาพวันสั้น (Park et al., 2008)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวในปัจจุบันอาศัยเทคโนโลยีที่ใช้วิเคราะห์พันธุกรรมที่สำคัญต่อลักษณะทางการเกษตรของข้าว ด้วยการใช้เทคโนโลยี NGS (Next-Generation Sequencing) ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด (whole genome sequencing; WGS) รวมถึงการแสดงออกของยีน ความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถระบุตำแหน่ง และหน้าที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเฉพาะต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Terauchi et al., 2012) โดยสามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ช่วยในการคัดเลือก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบมาตรฐานให้มีความแม่นยำมากขึ้น และสามารถลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ใหม่ ๆ รวดเร็วขึ้น

(Panahi et al., 2024) ดังนั้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นในประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 กับ ข้าวสายพันธุ์พ่อ ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเดี่ยว (KDML 105-PISD) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จะถูกใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD เพื่อคัดเลือกให้ข้าวมีอายุวันออกดอกสั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำขึ้น

วิธีการศึกษา

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ข้าวพันธุ์แม่ กข41 เป็นพันธุ์ข้าวเจ้าพื้นแข็ง ต้นเดี่ยว ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุเก็บเกี่ยว 105 วัน (กองวิจัยและพัฒนา กรมการข้าว, 2559) ได้จากการผสม 3 ทางระหว่างลูกผสมชั่วที่ 1 ของ CNT85059-27-1-3-2 และสุพรรณบุรี 60 นำไปผสมพันธุ์กับ RP217-635-8 ที่สถานีทดลองข้าวชัยนาทในฤดูนาปี 2539

ข้าวสายพันธุ์พ่อ ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเดี่ยว (KDML 105-PISD) ให้ชื่อย่อ KDML 105-PISD เป็นข้าวเจ้าสีขาว มีกลิ่นหอม ต้นเดี่ยว ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุวันออกดอก 103 วัน (ฤดูนาปรัง) และ 100 วัน (ฤดูนาปี) เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากโครงการทดสอบผลผลิตภายในสถานีของสายพันธุ์ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเดี่ยว ข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข15 และ ขาวดอกมะลิ 105 ได้รับทุนวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.)

ประชากร F_2 จำนวน 138 สายพันธุ์ ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 กับข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD โดยทำการปลูกศึกษาใน 2 ฤดู ภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น

การปลูกศึกษา และการบันทึกข้อมูลลักษณะอายุวันออกดอก (ฟีนไทป์)

การปลูกศึกษา ทำที่แปลงนาทดลองของศูนย์ปรับปรุงพันธุ์ข้าว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 2 ฤดู ได้แก่ ฤดูนาปรัง 2564 เป็นการศึกษาภายใต้สภาพวันยาว (natural long-day, NLD) เริ่มเพาะวันที่ 3 เมษายน พ.ศ. 2564 จนถึงเก็บเกี่ยวในปลายเดือน สิงหาคม พ.ศ. 2564 (ช่วงแสงมากกว่า 12.00 ชม./วัน โดยเฉลี่ย) และฤดูนาปี 2564 เป็นการศึกษาในสภาพวันสั้น (natural short-day, NSD) เริ่มเพาะวันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2564 จนถึงเก็บเกี่ยวในปลายเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2564 (ช่วงแสงน้อยกว่า 12.00 ชม./วัน โดยเฉลี่ย) ข้อมูลความยาวช่วงแสงรวบรวมจากสมาคมดาราศาสตร์ไทย (2564) โดยหลังจากเพาะกล้าข้าวได้อายุ 30 วัน ทำการถอน และปักดำในระยะ 25×25 ซม. โดยทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ปลูกข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105- PISD พันธุ์ละ 4 แถว และปลูกประชากร F_2 จำนวน 20 แถว มีการดูแลใส่ปุ๋ยเคมีจำนวน 4 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 หลังปักดำ 7 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 จำนวน 25 กก./ไร่ ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 ใส่หลังปักดำ 14 วัน และ 30 วันตามลำดับ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 จำนวน 12.5 กก./ไร่ ผสมกับปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 จำนวน 6.5 กก./ไร่ และครั้งที่ 4 หลังปักดำ 45 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 จำนวน 6.5 กก./ไร่ ผสมกับปุ๋ยเคมีสูตร 0-0-60 จำนวน 5 กก./ไร่ โดยปริมาณ ไนโตรเจน: ฟอสฟอรัส: โพแทสเซียม ทั้งหมดเท่ากับ 17: 8: 11 กก./ไร่ ตามลำดับ มีการป้องกันกำจัดโรค และแมลงตามความจำเป็น การบันทึกข้อมูลอายุวันออกดอก (ฟีนไทป์) ทำทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น โดยสุ่มตัวอย่างจากต้นข้าวใน 8 แถวที่ปลูกติดกัน และมีต้นข้าวอื่นล้อมรอบทั้ง 4 ด้าน โดยในข้าวพันธุ์แม่ และสายพันธุ์พ่อ เก็บข้อมูลจำนวนพันธุ์ละ 30 กอ และในประชากร F_2 เก็บข้อมูลจำนวน 138 กอ การบันทึกข้อมูลวันออกดอกเริ่มนับวันตั้งแต่วันเพาะจนถึงวันที่เริ่มออกดอก เมื่อรวงแรกโผล่พ้นออกจากต้น 50% เมื่อเมล็ดบนต้น F_2 สุกแก่เก็บเมล็ด (เมล็ด F_3) ของแต่ละต้นมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ต่อไป

การวิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์ และอินเดลจากการอ่านลำดับทั้งจีโนม (whole genome sequence; WGS) และค้นหาหรือออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น

การอ่านลำดับทั้งจีโนม (whole genome sequence; WGS) ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD กับบริษัท Novogene Biotech ประเทศจีน การอ่านลำดับเบสถูกเปรียบเทียบเข้ากับจีโนมอ้างอิงของข้าว คือ *Oryza sativa* ssp. *japonica* Nipponbare (Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0) (Tanaka et al., 2020) การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศสำหรับข้อมูลระดับจีโนมโดยห้างหุ้นส่วน จำกัด วอร์ด เมดิก ประเทศไทย ซึ่งในการวิเคราะห์ทำโดยการหาตำแหน่งสนิปส์ (single nucleotide

polymorphisms; SNPs) และอินเดล (insertion/deletion; InDel) ที่ต่างกันภายในยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอายุวันออกดอกของข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD มีขั้นตอนอย่างย่อดังนี้ 1) อ่านลำดับเบส (sequencing) ผ่านเครื่องอ่าน Illumina เพื่อถอดรหัส DNA ซึ่งจะได้ข้อมูลในรูปแบบของไฟล์ FASTQ file 2) ตรวจสอบคุณภาพ (quality control) โดยการนำข้อมูล FASTQ file มาวิเคราะห์ด้วยการใช้เครื่องมือ FASTQC, การทำ Trimming เพื่อตัดเบสคุณภาพต่ำออก และลดข้อมูลซ้ำซ้อนจากการทำพีซีอาร์ 3) จัดเรียงลำดับเบส (alignment) โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของข้าวพันธุ์แม่ และพ่อกับจีโนมอ้างอิง ทำการวิเคราะห์ข้อมูล ด้วยเครื่องมือ bwa หรือ Bowtie2 ซึ่งจะได้ข้อมูลในรูปแบบของไฟล์ BAM file 4) ตรวจหาความแตกต่างของลำดับเบส (variant calling และ annotation) โดยการวิเคราะห์หาความแปรผันทางพันธุกรรม (variants) แบบ SNPs และ InDel ตรวจหาข้อมูล annotation ได้แก่ ประเภทของ variant เช่น missense, synonymous, nonsynonymous, stop gain, stop-loss และ frameshift เป็นต้น ซึ่งจะได้ข้อมูลในรูปแบบของไฟล์ VCF file

การวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs และ InDel จากนั้นนำผลข้อมูลที่ได้จากการอ่านลำดับทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่และข้าวพันธุ์พ่อ มาเปรียบเทียบบริเวณรหัส (exon) ของยีนที่ควบคุมอายุวันออกดอกทั้งวิถี เพื่อค้นหาตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ SNPs, insertions และ deletions ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และอาจส่งผลต่อลักษณะที่ปรากฏหรือฟีโนไทป์ได้

การค้นหาลำดับเบสที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอายุวันออกดอก โดยการสืบค้นข้อมูลจากบทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง และจากฐานข้อมูลข้าวออนไลน์ในเว็บไซด์ต่าง ๆ ได้แก่ ฐานข้อมูล IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project [IRGSP], 2005) และฐานข้อมูล RAP-DB (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) นอกจากนี้ออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีนชนิด Indel จากการเทียบลำดับเบสระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD กับยีนที่ควบคุมอายุวันออกดอกข้าวทั้งวิถี ซึ่งได้ออกแบบในส่วนของยีน ได้แก่ บริเวณ exon และ intron บริเวณ upstream โปรโมเตอร์ และบริเวณ downstream เป็นต้น การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward primer และ reverse primer การออกแบบไพรเมอร์ใช้โปรแกรมออนไลน์ Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนนี้จะถูกนำไปตรวจสอบเพื่อคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD ในลำดับถัดไป และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้นำไปใช้ตรวจสอบจีโนมไทป์ในประชากร F₂ ต่อไป การตรวจสอบ และคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะอายุวันออกดอก ที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับข้าวพันธุ์พ่อ และนำไปตรวจสอบจีโนมไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากรที่สร้างขึ้น

สกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเมล็ดข้าวเปลือกของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD และลูกผสม F₁ โดยใช้ชุดสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA purification kit Cat no. K0512 ของบริษัท Thermo Scientific™ ดัดแปลงจากวิธีของ Fermentas นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น T100 Thermal cycler (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมอายุวันออกดอก โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) จีโนมิกส์ดีเอ็นเอประมาณ 50 ng ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.6 µM ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 15 µL ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ระยะที่ 1 Pre-Denaturing ที่อุณหภูมิ 94°C 2 นาที ระยะที่ 2 Denaturing ที่อุณหภูมิ 94°C 1 นาที ระยะที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 50-63°C (อุณหภูมิ annealing ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับค่า T_m คือ อุณหภูมิการหลอมละลายของไพรเมอร์ของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ) 1:30 นาที ระยะที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72°C 1:30 นาที โดยทำซ้ำจากระยะที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และระยะ Final Extension ที่อุณหภูมิ 72°C 5 นาที

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยผสมสารสีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (INTRON Biotechnology, Korea) ลงในสารละลายเจลเข้มข้น 4% ก่อนเทเจล จากนั้นอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรสในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า และระยะเวลาตามความเหมาะสมของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ เมื่อครบเวลาทำการบันทึกภาพด้วยเครื่อง Molecular Imager®Gel Doc™ XR+System

(บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟต์แวร์ Image Lab™ Software (บริษัท BIO-RAD Laboratory) จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอต่างกันอย่างชัดเจน โดยให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic band pattern) ระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD ส่วนลูกผสม F_1 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมือนข้าวพันธุ์แม่ กข41 จำนวน 1 แถบ และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD จำนวน 1 แถบ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้จะนำไปใช้ตรวจสอบในประชากรที่สร้างขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลจีโนไทป์ในลำดับถัดไป

การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร F_2 จำนวน 138 กอ ทั้ง 2 ฤดู คือ ภายใต้อากาศวันยาวและสภาพวันสั้น ทำการสุ่มเมล็ดข้าวเปลือกจำนวน 6 เมล็ดต่อกอ มาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอสำเร็จรูป เช่นเดียวกับการสกัดจีโนมิกส์ของข้าวพันธุ์แม่ และข้าวพันธุ์พ่อ จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอายุวันออกดอกที่คัดเลือกได้จากข้างต้น แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะการโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) จากนั้นบันทึกผลโดยกำหนดให้จีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์แม่ กข41 กำหนดสัญลักษณ์เป็น RDRD ให้คะแนนเท่ากับ 2 จีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD กำหนดสัญลักษณ์เป็น KMKM ให้คะแนนเท่ากับ 0 และจีโนไทป์แบบ heterozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ เหมือนกับข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD กำหนดสัญลักษณ์เป็น RDKM ให้คะแนนเท่ากับ 1

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมอายุวันออกดอกสั้น (จีโนไทป์) กับลักษณะอายุวันออกดอก (ฟีโนไทป์) ของประชากร F_2 ทั้งภายใต้อากาศวันยาวและสภาพวันสั้น ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ R version 4.2.1 ประกอบด้วย

1) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ของประชากร F_2 ทั้งภายใต้อากาศวันยาวและสภาพวันสั้น ด้วยวิธี One-way analysis of variance, completely random design (one-way ANOVA; CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่แบบ Least significant difference (LSD) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาพจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะฟีโนไทป์ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของฟีโนไทป์เมื่อจำแนกตามจีโนไทป์ คือ RDRD ซึ่งมีแอลลีล homozygous ของข้าวพันธุ์แม่ กข41, RDKM ซึ่งมีแอลลีล heterozygous ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD และ KMKM ซึ่งมีแอลลีล homozygous ของข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD หากพบว่า ค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอกในแต่ละจีโนไทป์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอก (ฟีโนไทป์)

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

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

ผลการศึกษา

การศึกษาลักษณะอายุวันออกดอก (ฟีนไทป์) ของข้าวพันธุ์แม่ ข้าวพันธุ์พ่อ และประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันยาว และสภาพวันสั้น

การศึกษาลักษณะอายุวันออกดอก (ฟีนไทป์) ของข้าวพันธุ์แม่ ข้าวพันธุ์พ่อ และประชากร F_2 โดยการบันทึกข้อมูล วันออกดอกเริ่มนับวันตั้งแต่วันเพาะจนถึงวันที่เริ่มออกดอก เมื่อรวงแรกโผล่พ้นออกจากต้น 50% โดยทำการศึกษาทั้งภายใต้ สภาพวันยาว (ช่วงแสงประมาณ 12.34 ถึง 13.14 ชม./วัน) และสภาพวันสั้น (ช่วงแสงประมาณ 11.15 ถึง 12.44 ชม./วัน) (Figure 1a) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกทางสถิติด้วย T- test ระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 (จำนวน 30 กอ) และ ข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD (จำนวน 30 กอ) พบว่า ค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น โดยภายใต้สภาพวันยาวค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของข้าวพันธุ์แม่ กข41 เท่ากับ 97.30 ± 1.78 วัน สั้นกว่าข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD ที่มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกเท่ากับ 103.60 ± 2.94 วัน อยู่ประมาณ 6 วัน และภายใต้สภาพวันสั้นค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของข้าวพันธุ์แม่ กข41 เท่ากับ 88.26 ± 1.50 วัน สั้นกว่าข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD ที่มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกเท่ากับ 90.93 ± 1.17 วัน อยู่ประมาณ 2 วัน (Figure 1b) ส่วนค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอก ของประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันยาวจากการสุ่มตัวอย่างจำนวน 138 กอ พบว่า มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกเท่ากับ 104.92 ± 8.01 วัน (อายุออกดอกเร็วที่สุด และช้าที่สุดเท่ากับ 90 และ 136 วัน ตามลำดับ) ส่วนประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันสั้น จากการสุ่มตัวอย่าง จำนวน 138 กอ พบว่า มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกเท่ากับ 91.39 ± 3.80 วัน (อายุออกดอกเร็วที่สุด และช้าที่สุด เท่ากับ 82 และ 102 วัน ตามลำดับ) (Table 1)

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอกระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41, ข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD และประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่แบบ LSD พบว่า ค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ได้แก่ ค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD และประชากร F_2 เป็นกลุ่มที่ 1 (a) และค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของ ข้าวพันธุ์แม่ กข41 เป็นกลุ่มที่ 2 (b) (Table 1) นอกจากนี้ พบว่า ข้าวพันธุ์แม่ กข41 มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกในสภาพวันยาวและ สภาพวันสั้นแตกต่างกัน ประมาณ 9.04 วัน ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD มีค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอก ภายใต้สภาพวันยาว และสภาพวันสั้นแตกต่างกันประมาณ 12.67 วัน

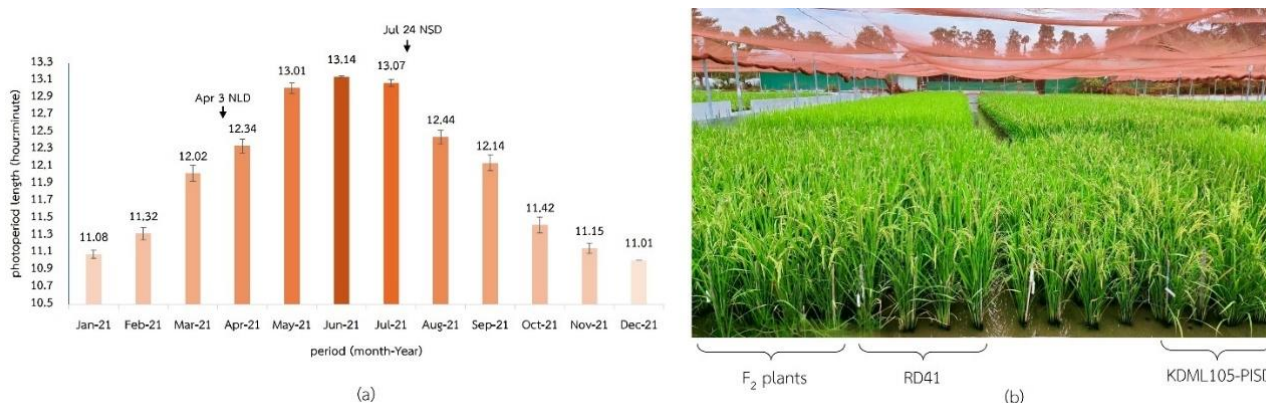


Figure 1 The study involves phenotypic characterization of the heading date. (a) Photoperiod lengths (in hours) for Natural Long-Day (NLD) and Natural Short-Day (NSD) conditions. Information adapted from the Thai Astronomical Society. (b) Comparing the heading date among RD41 rice variety, KDML105-PISD rice line, and F_2 population.

Table 1 Comparing the means of heading dates among the female parent, male parent and F₂ population growing under natural long-day and natural short-day conditions using ANOVA followed by the LSD test

Treatment	No. of plants	Heading date (days)					p-value
		Min	Median	Max	Mean	SD	
RD41 (NLD)	30	93	97	102	97.30 ^b	1.78	0.000**
F ₂ population (NLD)	138	90	104	136	104.92 ^a	8.01	
KDML 105-PISD (NLD)	30	98	103	108	103.60 ^a	2.94	
RD41 (NSD)	30	85	89	90	88.26 ^b	1.50	0.000**
F ₂ population (NSD)	138	82	90	102	91.39 ^a	3.80	
KDML 105-PISD (NSD)	30	89	91	93	90.93 ^a	1.17	

**Significance at $p < 0.01$, RD41: Female parent, KDML 105-PISD (male parent), F₂ progenies: F₂ population of RD41 rice variety and KDML 105-PISD rice line, NLD: Natural long-day, NSD: Natural short-day, SD: Standard deviation, Means with the same letter are not significantly different from each other ($p < 0.01$ ANOVA followed by LSD test).

การวิเคราะห์หาตำแหน่งสปีส์ และอินเดลจากการอ่านลำดับเบสทั้งจีโนม (whole genome sequence; WGS) และค้นหาหรือออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะอายุวันออกดอก

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาพื้นที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอายุวันออกดอกของข้าวทั้งวิถี จากการอ่านลำดับทั้งจีโนม (WGS) ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD จำนวน 56 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsGI*, *OsLFL1*, *OsMADS51*, *Se13*, *HDR1*, *OsCOL4*, *OsCRY2*, *OsVIL2*, *SDG725*, *Ehd4*, *Hd16*, *Hd6*, *OsCOL9*, *OsDof12*, *OsHAP5C*, *OsIDS1*, *OsMADS14*, *OsMADS50*, *OsPhyA*, *OsPhyB*, *OsPhyC*, *SDG718*, *Se14*, *HAF1*, *SDG708*, *OsHAPL1*, *OsLF*, *Hd1*, *Hd3a*, *Hd3b*, *OsFTIP1*, *OsHAP5B*, *RFT1*, *SDG711*, *SE5*, *Hd2*, *Hd4*, *OsMADS15*, *SNB*, *Ehd3*, *GF14c*, *Hd18*, *Hd5*, *OsHAP5D*, *OsK4*, *OsCO3*, *OsEMF2b*, *OsFD1*, *SDG723*, *SDG724*, *Ehd1*, *Ehd2*, *OsMADS56*, *DHD1*, *OsFKF1* และ *OsVIL1* (Yang et al., 2013; Lee and An, 2015; Liu et al., 2016; Takahashi et al., 2001; Komiya et al., 2008; Monna et al., 2002; Ishikawa et al., 2011; Matsubara et al., 2011; Shibaya et al., 2016; Zhang et al., 2019; Han et al., 2015; Wei et al., 2020; Zhou et al., 2021) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อบริเวณรหัสของยีนที่มีการกลายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ SNPs, insertions และ deletions ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ nonsynonymous, frameshift, stop-loss และ stop-gain ซึ่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป พบว่า มีจำนวน 20 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsVIL2*, *OsDof12*, *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsPhyC*, *Hd6*, *SDG708*, *OsLF*, *RFT1*, *Hd3a*, *Hd1*, *SDG711*, *Hd2*, *Ehd3*, *Hd18*, *OsHAP5D*, *OsEMF2b*, *Ehd2*, *OsFKF1* และ *DHD1* (Table 2)

จากการค้นหาข้อมูลจากบทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง และจากฐานข้อมูลข้าวออนไลน์ พบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน 3 ตำแหน่ง ซึ่งมี 3 เครื่องหมาย ดังนี้ บนโครโมโซมที่ 6 ได้แก่ ยีน *RFT1* (RFT1-5'UTR-PI1), *Hd3a* (Hd3a-in3-PI1) (ปฐมพร และคณะ, 2567) และ *Hd1* (*Hd1* marker) (วรารภรณ์ และคณะ, 2555) ตามลำดับ (Table 2) และทำการออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ที่จำเพาะกับยีนแต่ละตำแหน่ง สามารถออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีน 17 ตำแหน่ง ซึ่งมี 31 เครื่องหมาย ประกอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งของยีนจำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *OsDof12*, *Hd2* และ *OsEMF2b* และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน จำนวน 14 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsVIL2*, *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsPhyC*, *Hd6*, *SDG708*, *OsLF*, *SDG711*, *Ehd3*, *Hd18*, *OsHAP5D*, *Ehd2*, *OsFKF1* และ *DHD1*

การตรวจสอบ และคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะอายุวันออกดอก ที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่กับข้าวสายพันธุ์พ่อ และนำไปตรวจสอบจีโนมไทป์ในประชากรที่สร้างขึ้น

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนทั้ง 20 ตำแหน่ง (34 เครื่องหมาย) ข้างต้น มาตรวจสอบ และคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ สามารถคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนได้จำนวน 20 ตำแหน่ง (Table 2) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ co-dominance คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกแยะระหว่าง homozygous และ heterozygous ได้ โดยคัดเลือกยีนละหนึ่งเครื่องหมาย ได้ดังนี้ บนโครโมโซมที่ 2 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsVIL2* (Figure 2a) บนโครโมโซมที่ 3 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDof12*, *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsPhyC* และ *Hd6* (Figure 2b-f) บนโครโมโซมที่ 4 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *SDG708* (Figure 2g) บนโครโมโซมที่ 5 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsLF* (Figure 2h) บนโครโมโซมที่ 6 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1*, *Hd3a*, *Hd1* และ *SDG711* (Figure 2i-l) บนโครโมโซมที่ 7 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2* (Figure 2m) บนโครโมโซมที่ 8 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Ehd3*, *Hd18* และ *OsHAP5D* (Figure 2n-p) บนโครโมโซมที่ 9 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsEMF2b* (Figure 2r) บนโครโมโซมที่ 10 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Ehd2* (Figure 2s) และบนโครโมโซมที่ 11 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsFKF1* และ *DHD1* (Figure 2s-t)

Table 2 Detailed information for the 20 DNA markers of genes involved in controlling heading date and the insertion/deletion (indel) positions for the design of new markers

No.	Gene names	Gene ID	Chr.	Reference of Genes	Type of mutation	Annotation	Variety of sequence		Primer name	Gene Distance (bp)	Distance base (bp)	Product size (bp)	Sources of DNA markers
							RD41	KDML105 -PISD					
1	<i>OsVIL2</i>	Os02g0152500	2	Yang et al. (2013)	nonsyn. ^{1/}	exon4:c.G1576A;p.V526I	G	A	OsVIL2LOWAW1	276	14	229	new design
2	<i>OsDof12</i>	Os03g0169600	3	Lee and, An (2015)	nonsyn. ^{1/}	exon4:c.A1265C;p.Y422S	A	C	OsDof12Intron1AW1	557	20	256	new design
					nonsyn. ^{1/}	exon3:c.T1001C;p.L334S	T	C					
					nonsyn. ^{1/}	exon2:c.T263C;p.V88A	T	C					
					nonsyn. ^{1/}	exon2:c.G800C;p.G267A	G	C					
3	<i>OsCOL9</i>	Os03g0711100	3	Liu et al. (2016)	nonsyn. ^{1/}	exon1:c.C230T;p.A77V	T	C	OsCOL9LOWAW1	27,500	11	298	new design
4	<i>OsPhyA</i>	Os03g0719800	3	Lee and, An (2015)	nonsyn. ^{1/}	exon2:c.G415A;p.A139T	A	G	OsPhyALow2AW1	464,376	13	205	new design
5	<i>OsPhyC</i>	Os03g0752100	3	Lee and, An (2015)	nonsyn. ^{1/}	exon2:c.T391C;p.W131R	C	T	OsPhyCLOWAW1	18,469	15	266	new design
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.G1511A;p.C504Y	G	A					
					nonsyn. ^{1/}	exon3:c.T3074C;p.M1025T	C	T					
					nonsyn. ^{1/}	exon3:c.T3140C;p.I1047T	C	T					
					nonsyn. ^{1/}	exon4:c.T3325G;p.S1109A	G	T					

Table 2 (continued)

No	Gene names	Gene ID	Chr	Reference of Genes	Type of mutation	Annotation	Variety of sequence		Primer name	Gene Distance (bp)	Distance base (bp)	Product size (bp)	Sources of DNA markers
							RD41	KDML105 -PISD					
6	<i>Hd6</i>	Os03g0762000	3	Takahashi et al. (2001)	nonsyn. ^{1/}	exon1:c.C11T;p.A4V	C	T	Hd6Low1AW1	225,313	18	120	new design
7	<i>SDG708</i>	Os04g0429100	4	Liu et al. (2016)	nonsyn. ^{1/}	exon9:c.T1232C;p.V411A	T	C	SDG708Top2AW1	27,268	29	150	new design
					nonsyn. ^{1/}	exon10:c.G1303C;p.E435Q	G	C					
					nonsyn. ^{1/}	exon10:c.C1517A;p.T506K	C	A					
8	<i>OsLF</i>	Os05g0541400	5	Lee and, An (2015)	Frameshift ^{2/}	exon2:c.865_866insGG;p.P289fs	-	GG	OsLFTOPAW1	1,371,579	18	233	new design
					nonsyn. ^{1/}	exon2:c.C604T;p.P202S	C	T					
					nonsyn. ^{1/}	exon2:c.G665C;p.G222A	G	C					
					nonsyn. ^{1/}	exon2:c.T703C;p.C235R	T	C					
9	<i>RFT1</i>	Os06g0157500	6	Komiya et al. (2008)	nonsyn. ^{1/}	exon1:c.T92C;p.V31A	T	C	RFT1-5'UTR-PI1	65	22	293	Patomporn et al. (2024)
					nonsyn. ^{1/}	exon4:c.G313A;p.E105K	G	A					
					nonsyn. ^{1/}	exon4:c.G431A;p.S144N	G	A					
					nonsyn. ^{1/}	exon4:c.A478G;p.T160A	A	G					
10	<i>Hd3a</i>	Os06g0157700	6	Monna et al. (2002)	nonsyn. ^{1/}	exon4:c.C535A;p.P179T	C	A	Hd3a-in3-PI1	1,547	11	198	Patomporn et al. (2024)
					nonsyn. ^{1/}	exon4:c.C536A;p.P179H	C	A					

Table 2 (continued)

No	Gene names	Gene ID	Chr	Reference of Genes	Type of mutation	Annotation	Variety of sequence		Primer name	Gene Distance (bp)	Distance base (bp)	Product size (bp)	Sources of DNA markers
							RD41	KDML105 -PISD					
11	<i>Hd1</i>	Os06g0275000	6	Ishikawa et al. (2011)	frameshift deletion ^{3/}	exon2:c.1053_1056del;p.R351fs	-	AAGA	<i>Hd1</i> marker	unknown ^{5/}	unknown ^{5/}	unknown ^{5/}	Varaporn et al. (2008)
12	<i>SDG711</i>	Os06g0275500	6	Liu et al. (2014)	nonsyn. ^{1/}	exon6:c.T755A;p.L252H	A	T	SDG711TOPAW1	234	14	284	new design
13	<i>Hd2</i>	Os07g0695100	7	Lee and, An (2015)	nonsyn. ^{1/}	exon4:c.T125C;p.I42T	C	T	Hd2Exon1AW1	82	9	173	new design
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.T36G;p.D12E	G	T					
					nonsyn. ^{1/}	exon4:c.A473G;p.N158S	G	A					
					nonsyn. ^{1/}	exon9:c.G1147A;p.A383T	A	G					
					nonsyn. ^{1/}	exon9:c.G1259A;p.G420D	A	G					
					nonsyn. ^{1/}	exon10:c.A1369G;p.M457V	G	A					
					nonsyn. ^{1/}	exon10:c.T1385C;p.L462P	C	T					
					nonsyn. ^{1/}	exon10:c.G1397T;p.S466I	T	G					
14	<i>Ehd3</i>	Os08g0105000	8	Matsubara et al. (2011)	nonsyn. ^{1/}	exon3:c.C317T;p.A106V	C	T	Ehd3LowAW1	22,772	17	294	new design
15	<i>Hd18</i>	Os08g0143400	8	Shibaya et al. (2016)	nonsyn. ^{1/}	exon1:c.G499A;p.V167I	A	G	Hd18Top1AW1	99	22	185	new design
16	<i>OsHAP5D</i>	Os08g0496500	8	Zhang et al. (2019)	nonsyn. ^{1/}	exon1:c.G145C;p.A49P	G	C	OsHAP5DTOPAW1	2,039	21	388	new design

Table 2 (continued)

No.	Gene names	Gene ID	Chr.	Reference of Genes	Type of mutation	Annotation	Variety of sequence		Primer name	Gene Distance (bp)	Distance base (bp)	Product size (bp)	Sources of DNA markers
							RD41	KDML105 -PISD					
17	<i>OsEMF2b</i>	Os09g0306800	9	Lee and, An (2015)	nonsyn. ^{1/}	exon9:c.A841G;p.I281V	A	G	OsEMF2bExon20AW1	12,369	12	260	new design
18	<i>Ehd2</i>	Os10g0419200	10	Lee and, An (2015)	nonsyn. ^{1/}	exon9:c.G739T;p.V247F	G	T	Ehd2 Low PI1	22,137	16	219	new design
					nonsyn. ^{1/}	exon3:c.C1337T;p.A446V,	T	C					
					nonsyn. ^{1/}	exon3:c.G1069A;p.G357S	A	G					
19	<i>OsFKF1</i>	Os11g0547000	11	Han et al. (2015)	nonsyn. ^{1/}	exon3:c.A835T;p.S279C	T	A	OsFKF1Top1AW1	140,994	19	150	new design
					nonsyn. ^{1/}	exon2:c.T664G;p.C222G,- 02:exon1:c.T418G;p.C140G	G	T					
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.T165G;p.D55E	G	T					
20	<i>DHD1</i>	Os11g0706200	11	Zhang et al. (2019)	nonsyn. ^{1/}	exon1:c.G43A;p.E15K	G	A	DHD1LOWAW1	4,224	14	349	new design
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.A212T;p.Q71L	A	T					
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.A346G;p.T116A	G	A					
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.G393T;p.K131N	G	T					
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.G494A;p.R165H	G	A					
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.C893T;p.T298M	C	T					
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.G1216A;p.E406K	A	G					
					nonsyn. ^{1/}	exon1:c.G1273A;p.E425K	G	A					
					stopgain ^{4/}	exon1:c.C1723T;p.R575X	C	T					
nonsyn. ^{1/}	exon1:c.G1777A;p.G593R	A	G										

^{1/} nonsyn. stands for "Nonsynonymous" refers to a single nucleotide mutation that results in a changed amino acid sequence, ^{2/} Frameshift is when the base sequence is added or deleted from the normal sequence, causing a shift in the reading frame, which results in a change in the amino acids from the point of the frameshift. This alteration can affect the amino acids and may impact the phenotype, ^{3/} Frameshift deletion was an indel mutation that altered the open reading frame due to a deletion, ^{4/} stopgain is when a change in the base sequence results in the creation of a stop codon, causing the amino acid chain to be shorter than usual, ^{5/} unknown means that there is no report or clear information available at the moment, 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.

เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนทั้ง 20 ตำแหน่งข้างต้น ถูกนำมาใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 ทั้งภายใต้สภาพวันยาว และสภาพวันสั้น จำนวน 138 กอ พบว่า ทั้ง 20 ตำแหน่ง (Table 2) ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และสามารถแยกกลุ่มจีโนไทป์ของประชากร F_2 ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าวพันธุ์แม่ กข41 กำหนดสัญลักษณ์เป็น RDRD ให้คะแนนเท่ากับ 2 กลุ่มที่ 2 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD กำหนดสัญลักษณ์เป็น KMKM ให้คะแนนเท่ากับ 0 และกลุ่มที่ 3 มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ เหมือนข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD กำหนดสัญลักษณ์เป็น RDKM ให้คะแนนเท่ากับ 1 (Figure 2a-t)

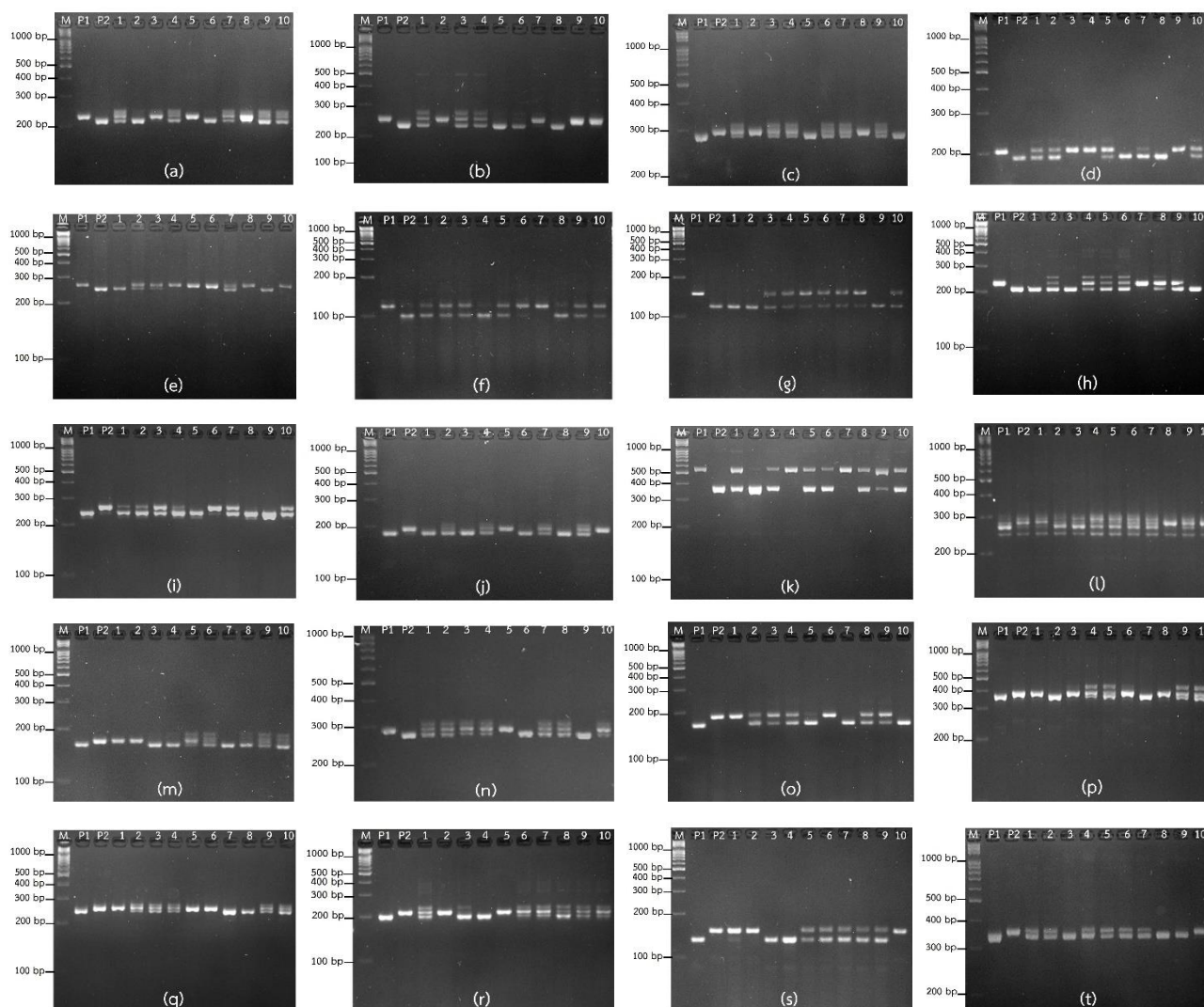


Figure 2 PCR amplified fragments of the 20 DNA markers located at or linked to the genes controlling rice heading date. (a) *OsVIL2*; (b) *OsDof12*; (c) *OsCOL9*; (d) *OsPhyA*; (e) *OsPhyC*; (f) *Hd6*; (g) *SDG708*; (h) *OsLF*; (i) *RFT1*; (j) *Hd3a*; (k) *Hd1*; (l) *SDG711*; (m) *Hd2*; (n) *Ehd3*; (o) *Hd18*; (p) *OsHAP5D*; (q) *OsEMF2b*; (r) *Ehd2*; (s) *OsFKF1*; (t) *DHD1*. Lane M represented a 100 bp DNA ladder, Lane P1 represented, Lane P2 represented KDML 105-PISD, and Lanes 1-10 contained samples from the F_2 population.

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยืติดกับยีนที่ควบคุมอายุวันออกดอกกับอายุวันออกดอกในของประชากร F_2 ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น

จากการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยืติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอายุวันออกดอกในข้างต้นไปตรวจสอบในประชากร F_2 จำนวน 138 กอ ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น จากนั้นนำผลข้อมูลการศึกษาที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 20 ตำแหน่ง กับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบรายคู่ (least significant difference, LSD) โดยจะถูกจำแนกตามจีโนไทป์ ได้แก่ RDRD, RDKM และ KMKM หากพบว่า ค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอกในแต่ละจีโนไทป์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอก (ฟีโนไทป์) พบว่า ภายใต้สภาพวันยาว จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *RFT1*, *Hd3a*, *SDG711* และ *Hd2* กับค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsDof12*, *Hd1*, *Hd18* และ *Hd6* กับค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3) ในขณะเดียวกันพบว่า ภายใต้สภาพวันสั้น จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsPhyC*, *Hd6*, *RFT1* และ *Hd3a* กับค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsVIL2*, *Hd1*, *Hd18* และ *Ehd2* กับค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3) ดังนั้น ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *Hd6*, *RFT1*, *Hd3a*, *Hd1* และ *Hd18* กับค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกมีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3)

เมื่อวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยวิธี Pearson correlation พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอมีระดับความสัมพันธ์ที่ต่ำถึงปานกลางกับลักษณะอายุวันออกดอก ดังนี้ ภายใต้สภาพวันยาว พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsDof12*, *Hd6*, *RFT1*, *Hd3a*, *Hd1* และ *SDG711* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ -0.269, -0.229, -0.604, -0.590, -0.225 และ -0.252 ตามลำดับ (Table 4) ในขณะเดียวกันพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2* มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 0.460 (Table 4) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsCOL9*, *OsPhyA* และ *OsPhyC* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ -0.187, -0.174 และ -0.202 ตามลำดับ (Table 4) ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยวิธี Pearson correlation ในประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันสั้น พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsPhyC*, *Hd6*, *RFT1* และ *Hd3a* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ -0.369, -0.334, -0.400, -0.440, -0.422 และ -0.422 ตามลำดับ (Table 4) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนจำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsDof12*, *Hd1* และ *SDG711* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ -0.175, -0.171 และ -0.183 ตามลำดับ (Table 4) ในขณะเดียวกันพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsVIL2* และ *Ehd2* มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 0.167 และ 0.177 ตามลำดับ (Table 4) ดังนั้น ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsDof12*, *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsPhyC*, *Hd6*, *RFT1*, *Hd3a*, *Hd1*, และ *SDG711* กับอายุวันออกดอกมีความสัมพันธ์เชิงลบทางสถิติ (Table 4)

Table 3 ANOVA analysis of the relationship between the genotype of DNA markers and the phenotype (heading date) of the F₂ population under natural long-day and natural short-day conditions

No.	DNA markers of genes	Genotype	Heading date (n = 138)				Heading date (n = 138)			
			Natural long-day				Natural short-day			
			Number	Mean	SD	P value	Number	Mean	SD	P value
1	<i>OsVIL2</i>	RDRD	35	106.6	8.179	0.352 ^{ns}	42	91.54 ^a	3.833	0.005*
		RDKM	68	104.23	7.178		63	92.22 ^a	3.871	
		KMKM	35	104.57	9.294		33	89.63 ^b	3.111	
2	<i>OsDof12</i>	RDRD	32	102.37 ^b	6.973	0.004*	31	90.29	3.796	0.115 ^{ns}
		RDKM	74	104.39 ^b	7.042		72	91.47	3.688	
		KMKM	32	108.69 ^a	9.819		35	92.23	3.934	
3	<i>OsCOL9</i>	RDRD	30	102.73	5.065	0.089 ^{ns}	31	89.84 ^b	3.195	0.000**
		RDKM	73	104.78	8.140		70	90.84 ^b	3.590	
		KMKM	35	107.08	9.354		37	93.76 ^a	3.685	
4	<i>OsPhyA</i>	RDRD	35	103.31	6.201	0.108 ^{ns}	37	90.08 ^b	3.077	0.000**
		RDKM	69	104.58	8.121		65	90.93 ^b	3.779	
		KMKM	34	107.26	9.080		36	93.58 ^a	3.714	
5	<i>OsPhyC</i>	RDRD	40	103.00	6.353	0.055 ^{ns}	42	90.07 ^b	3.071	0.000**
		RDKM	61	104.70	8.281		62	90.69 ^b	3.277	
		KMKM	37	107.35	8.725		34	94.32 ^a	4.080	
6	<i>Hd6</i>	RDRD	41	102.27 ^b	5.675	0.023*	45	89.76 ^c	3.016	0.000**
		RDKM	60	105.38 ^{ab}	8.587		77	91.43 ^b	3.473	
		KMKM	37	107.10 ^a	8.631		16	95.87 ^a	3.897	
7	<i>SDG708</i>	RDRD	38	105.16	6.668	0.423 ^{ns}	36	91.63	3.863	0.175 ^{ns}
		RDKM	63	104.03	8.221		79	91.68	3.726	
		KMKM	37	106.18	8.900		23	90.04	3.879	
8	<i>OsLF</i>	RDRD	34	105.12	8.097	0.851 ^{ns}	30	91.65	2.418	0.532 ^{ns}
		RDKM	72	104.57	7.841		78	91.08	3.901	
		KMKM	32	105.50	8.516		30	91.93	4.719	
9	<i>RFT1</i>	RDRD	35	98.97 ^c	4.643	0.000**	33	89.70 ^b	3.067	0.000**
		RDKM	71	104.25 ^b	5.766		81	91.03 ^b	3.333	
		KMKM	32	112.91 ^a	8.848		24	94.95 ^a	4.102	
10	<i>Hd3a</i>	RDRD	37	98.86 ^c	4.435	0.000**	33	89.70 ^b	3.067	0.000**
		RDKM	68	104.52 ^b	5.952		81	91.03 ^b	3.333	
		KMKM	33	112.36 ^a	8.909		24	94.95 ^a	4.102	
11	<i>Hd1</i>	RDRD	32	101.69 ^b	5.733	0.021*	33	89.93 ^b	4.077	0.040*
		RDKM	69	105.38 ^a	8.099		81	91.88 ^a	3.579	
		KMKM	37	106.86 ^a	8.867		24	91.79 ^{ab}	3.833	
12	<i>SDG711</i>	RDRD	26	101.08 ^b	5.245	0.009**	36	90.11	3.991	0.056 ^{ns}
		RDKM	62	104.90 ^a	7.936		72	91.76	3.671	
		KMKM	50	106.94 ^a	8.667		30	92.06	3.667	

Table 3 (continued)

No.	DNA markers of genes	Genotype	Heading date (n = 138)				Heading date (n = 138)			
			Natural long-day				Natural short-day			
			umber	Mean	SD	P value	Number	Mean	SD	P value
13	<i>Hd2</i>	RDRD	34	110.00 ^a	8.397	0.000**	37	91.62	3.818	0.090 ^{ns}
		RDKM	74	105.11 ^b	7.157		72	91.83	3.907	
		KMKM	30	99.00 ^c	5.540		29	90.03	3.322	
14	<i>Ehd3</i>	RDRD	47	106.25	8.053	0.375 ^{ns}	44	90.97	2.857	0.662 ^{ns}
		RDKM	65	104.24	8.058		68	91.54	4.126	
		KMKM	26	104.19	7.828		26	91.73	4.396	
15	<i>Hd18</i>	RDRD	42	107.43 ^a	7.988	0.049*	42	91.11 ^{ab}	3.270	0.029*
		RDKM	64	103.65 ^b	8.167		67	92.17 ^a	4.007	
		KMKM	32	104.15 ^{ab}	7.171		29	90.00 ^b	3.723	
16	<i>OsHAP5D</i>	RDRD	28	105.46	9.773	0.908 ^{ns}	26	91.19	3.020	0.910 ^{ns}
		RDKM	78	104.87	7.040		79	91.52	4.044	
		KMKM	32	104.56	8.780		33	91.27	3.875	
17	<i>OsEMF2b</i>	RDRD	39	105.69	9.177	0.779 ^{ns}	33	91.58	3.849	0.400 ^{ns}
		RDKM	61	104.59	7.792		68	91.71	3.891	
		KMKM	38	104.66	7.208		37	90.68	3.621	
18	<i>Ehd2</i>	RDRD	30	104.30	7.405	0.793 ^{ns}	28	91.75 ^{ab}	3.826	0.023*
		RDKM	70	105.37	8.676		73	92.00 ^a	3.937	
		KMKM	38	104.58	7.321		37	89.95 ^b	3.197	
19	<i>OsFKF1</i>	RDRD	31	104.35	6.036	0.118 ^{ns}	33	90.88	4.204	0.050 ^{ns}
		RDKM	71	106.19	8.186		70	92.15	3.847	
		KMKM	36	102.89	8.847		35	90.37	3.040	
20	<i>DHD1</i>	RDRD	34	106.94	9.172	0.198 ^{ns}	28	91.96	4.141	0.304 ^{ns}
		RDKM	75	104.56	7.871		79	91.54	3.583	
		KMKM	29	103.48	6.626		61	90.51	4.032	

**Significance at $p < 0.01$, *Significance at $p < 0.05$, ^{ns} Non-significance, RDRD Homozygous for RD41 alleles, RDKM: Heterozygous for RD41 and KDML 105-PISD allele, KMKM: Homozygous for KDML 105-PISD allele, n: Number of random samples in the F₂ population under natural long-day and natural short-day conditions, SD: Standard deviation. Means with the same letter are not significantly different from each other ($p < 0.01$ ANOVA followed by LSD test).

Table 4 Correlation coefficients (r) were calculated using Pearson correlation analysis of the 20 DNA markers located at or linked to the genes and their relationship with the heading date of F₂ population under natural long-day and natural short-day conditions

No.	DNA markers of genes	Chr.	Heading date			
			Natural long-day (n = 138)		Natural short-day (n = 138)	
			r	P value	r	P value
1	<i>OsVIL2</i>	2	0.090	0.291 ^{ns}	0.167	0.049*
2	<i>OsDof12</i>	3	-0.269	0.001**	-0.175	0.039*
3	<i>OsCOL9</i>	3	-0.187	0.027*	-0.369	0.000**
4	<i>OsPhyA</i>	3	-0.174	0.040*	-0.334	0.000**
5	<i>OsPhyC</i>	3	-0.202	0.017*	-0.400	0.000**
6	<i>Hd6</i>	3	-0.229	0.006**	-0.440	0.000**
7	<i>SDG708</i>	4	-0.046	0.586 ^{ns}	0.117	0.169 ^{ns}
8	<i>OsLF</i>	5	-0.015	0.856 ^{ns}	-0.022	0.795 ^{ns}
9	<i>RFT1</i>	6	-0.604	0.000**	-0.422	0.000**
10	<i>Hd3a</i>	6	-0.590	0.000**	-0.422	0.000**
11	<i>Hd1</i>	6	-0.225	0.007**	-0.171	0.043*
12	<i>SDG711</i>	6	-0.252	0.002**	-0.183	0.031*
13	<i>Hd2</i>	7	0.460	0.000**	0.132	0.121 ^{ns}
14	<i>Ehd3</i>	8	0.104	0.223 ^{ns}	-0.074	0.387 ^{ns}
15	<i>Hd18</i>	8	0.161	0.058 ^{ns}	0.077	0.366 ^{ns}
16	<i>OsHAP5D</i>	8	0.036	0.668 ^{ns}	-0.003	0.967 ^{ns}
17	<i>OsEMF2b</i>	9	0.048	0.570 ^{ns}	0.087	0.307 ^{ns}
18	<i>Ehd2</i>	10	-0.007	0.932 ^{ns}	0.177	0.037*
19	<i>OsFKF1</i>	11	0.072	0.398 ^{ns}	0.051	0.551 ^{ns}
20	<i>DHD1</i>	11	0.148	0.082 ^{ns}	0.126	0.140 ^{ns}

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

การวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายด้วยวิธี Simple regression ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะอายุวันออกดอก (ฟีนไทป์) ในประชากร F₂ ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น ด้วยสมการถดถอย $\hat{y} = a + bx$ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination; R²) ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยอย่างง่ายในประชากร F₂ ภายใต้สภาพวันยาว พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsDof12*, *Hd6*, *RFT1*, *Hd3a*, *Hd1* และ *SDG711* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งจากค่า a และ b ที่แสดงใน Table 5 สามารถใช้ทำนายค่าฟีนไทป์ คือ อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) ได้ดังนี้ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDof12* มีค่า a เท่ากับ 108.07

และค่า b เท่ากับ -3.15 ได้สมการทำนาย $\hat{y} = 108.07 - 3.15 OsDof12$ แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDof12* ได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 3.15 วัน ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 7.24% (Table 5) ทำนองเดียวกันจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *Hd6*, *RFT1*, *Hd3a*, *Hd1* และ *SDG711* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -2.43, -6.92, -6.62, -2.54 และ -2.79 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล ทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 2.43, 6.92, 6.62, 2.54 และ 2.79 วัน ตามลำดับ ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 5.25%, 36.52%, 34.82%, 5.08% และ 6.38% ตามลำดับ (Table 5) ในขณะเดียวกันพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2* มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 5.48 ได้สมการทำนาย $\hat{y} = 99.35 + 5.48 Hd2$ แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2* ได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้น 5.48 วัน ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 21.22% (Table 5) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsCOL9*, *OsPhyA* และ *OsPhyC* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับอายุวันออกดอก จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsCOL9* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -2.18 ได้สมการทำนาย $\hat{y} = 107.02 - 2.18 OsCOL9$ แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsCOL9* ได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล ทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 2.18 วัน ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 3.50% (Table 5) ทำนองเดียวกันจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsPhyA* และ *OsPhyC* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -1.97 และ -2.16 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล ทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 1.97 และ 2.16 วัน ตามลำดับ ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 3.04% และ 4.10% ตามลำดับ (Table 5)

ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยอย่างง่ายในประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันสั้น พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsPhyC*, *Hd6*, *RFT1* และ *Hd3a* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งจากค่า a และ b ที่แสดงใน Table 5 สามารถใช้ทำนายค่าฟีโนไทป์ คือ อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) ได้ดังนี้ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsCOL9* มีค่า a เท่ากับ 93.31 และค่า b เท่ากับ -2.00 ได้สมการทำนาย $\hat{y} = 93.31 - 2.00 OsCOL9$ แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsCOL9* ได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 2.00 วัน ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 13.66% (Table 5) ทำนองเดียวกันจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsPhyA*, *OsPhyC*, *Hd6*, *RFT1* และ *Hd3a* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -1.74, -2.05, -2.65, -2.51 และ -2.51 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล ทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 1.74, 2.05, 2.65, 2.51 และ 2.51 วัน ตามลำดับ ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 11.19%, 16.05%, 19.42%, 17.88% และ 17.88% ตามลำดับ (Table 5) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsDof12*, *Hd1* และ *SDG711* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับอายุวันออกดอก จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDof12* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -0.96 ได้สมการทำนาย $\hat{y} = 92.33 - 0.96 OsDof12$ แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDof12* ได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล ทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 0.96 วัน ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 3.07% (Table 5) ทำนองเดียวกันจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd1* และ *SDG711* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -1.02 และ -1.01 ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล ทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 1.02 และ 1.01 วัน ตามลำดับ ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 2.95% และ 3.37% ตามลำดับ (Table 5) ในขณะเดียวกันพบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsVIL2* และ *Ehd2* มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับอายุวันออกดอก ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 0.86 ได้สมการทำนาย $\hat{y} = 90.47 + 0.86 OsVIL2$ แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsVIL2* ได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล ทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้น 0.86 วัน ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 2.80% (Table 5) ทำนองเดียวกันจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Ehd2* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 0.98 แสดงว่า ถ้าได้แอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่

กข41 เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล ทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้น 0.98 ซึ่งสามารถอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอก (R^2) ได้ 3.15% ตามลำดับ (Table 5)

Table 5 Simple regression analysis of the relationship between genotypes of DNA markers and phenotype (heading date) of F_2 populations under natural long-day and natural short-day conditions, with the regression model $\hat{y} = a + bx$

No.	DNA markers of genes (x)	Heading date ($\hat{y}$)									
		Natural long-day (n = 138)					Natural short-day (n = 138)				
		a	b	SE	R ² (%)	P value	a	b	SE	R ² (%)	P value
1	<i>OsVIL2</i>	103.90	1.01	1.175	0.81	0.291 ^{ns}	90.47	0.86	0.565	2.80	0.049*
2	<i>OsDof12</i>	108.07	-3.15	-3.156	7.24	0.001**	92.33	-0.96	0.553	3.07	0.039*
3	<i>OsCOL9</i>	107.02	-2.18	1.161	3.50	0.027*	93.31	-2.00	0.512	13.66	0.000**
4	<i>OsPhyA</i>	106.90	-1.97	1.173	3.04	0.040*	93.15	-1.74	0.524	11.19	0.000**
5	<i>OsPhyC</i>	107.13	-2.16	1.136	4.10	0.017*	93.57	-2.05	0.520	16.05	0.000**
6	<i>Hd6</i>	107.42	-2.43	1.130	5.25	0.006**	94.60	-2.65	0.632	19.42	0.000**
7	<i>SDG708</i>	105.43	-0.50	1.158	0.21	0.587 ^{ns}	90.64	0.68	0.635	1.38	0.170 ^{ns}
8	<i>OsLF</i>	105.10	-0.18	1.216	0.02	0.856 ^{ns}	91.52	-0.12	0.590	0.04	0.796 ^{ns}
9	<i>RFT1</i>	111.99	-6.92	0.969	36.52	0.000**	94.07	-2.51	0.573	17.88	0.000**
10	<i>Hd3a</i>	111.73	-6.62	0.972	34.82	0.000**	94.07	-2.51	0.573	17.88	0.000**
11	<i>Hd1</i>	107.37	-2.54	1.129	5.08	0.007**	92.48	-1.02	0.623	2.95	0.043*
12	<i>SDG711</i>	107.23	-2.79	1.007	6.38	0.002**	92.45	-1.01	0.580	3.37	0.031*
13	<i>Hd2</i>	99.35	5.48	1.103	21.22	0.000**	90.62	0.73	0.591	1.75	0.121 ^{ns}
14	<i>Ehd3</i>	103.57	1.17	1.296	1.08	0.224 ^{ns}	91.85	-0.40	0.616	0.54	0.388 ^{ns}
15	<i>Hd18</i>	103.02	1.77	1.202	2.61	0.058 ^{ns}	90.94	0.41	0.595	0.59	0.367 ^{ns}
16	<i>OsHAP5D</i>	104.48	0.44	1.219	0.13	0.669 ^{ns}	91.41	-0.02	0.575	0.00	0.967 ^{ns}
17	<i>OsEMF2b</i>	104.39	0.52	1.148	0.23	0.571 ^{ns}	90.94	0.46	0.548	0.76	0.308 ^{ns}
18	<i>Ehd2</i>	104.99	-0.08	1.148	0.00	0.932 ^{ns}	90.47	0.98	0.543	3.15	0.037*
19	<i>OsFKF1</i>	104.11	0.83	1.167	0.52	0.398 ^{ns}	91.12	0.27	0.560	0.26	0.551 ^{ns}
20	<i>DHD1</i>	103.09	1.75	1.241	2.20	0.082 ^{ns}	90.68	0.73	0.581	1.59	0.140 ^{ns}

**Significance at $p < 0.01$, * indicates significance at $p < 0.05$, ^{ns} Non-significance, n: Number of random samples in the F_2 population under natural long-day and natural short-day conditions, ($\hat{y}$): heading date, a: The constant term, b: Regression coefficient, x: Genotype of DNA marker, SE: Standard error, R²: Coefficient of determination.

จากผลการศึกษาดังกล่าวอย่างง่าย (simple regression) ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 20 ตำแหน่ง กับลักษณะอายุวันออกดอก ในประชากร F_2 พบว่า ภายใต้สภาพวันยาว จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsDof12*, *Hd6*, *RFT1*, *Hd3a*, *Hd1* และ *SDG711* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และมีเพียง 1 ตำแหน่ง ได้แก่ *Hd2* ที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsCOL9*, *OsPhyA* และ *OsPhyC* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่า ภายใต้สภาพวันสั้น จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsPhyC*, *Hd6*, *RFT1* และ *Hd3a* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ส่วนจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนจำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsDof12*, *Hd1* และ *SDG711* มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีเพียง 2 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsVIL2*

และ *Ehd2* ที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังนั้น ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น พบว่า จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ *OsDof12*, *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsPhyC*, *Hd6*, *RFT1*, *Hd3a*, *Hd1*, และ *SDG711* มีความสัมพันธ์เชิงลบทางสถิติกับอายุวันออกดอก (Table 5)

จากนั้นนำเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้มาวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณด้วยวิธี Multiple regression เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งตำแหน่งกับลักษณะอายุวันออกดอก แต่เพื่อป้องกันปัญหา multicollinearity เมื่อตัวแปรอิสระมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีความสัมพันธ์ทางสถิติ ซึ่งอาจทำให้การตัดสินใจผิดพลาดได้ จึงใช้การเลือกตัวแปรโดยการถดถอยทีละขั้น (stepwise regression) ทำให้การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของรูปแบบที่ดีที่สุด ภายใต้สภาพวันยาว พบว่า รูปแบบที่ดีที่สุด คือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1*, *Hd2*, *OsDof12* และ *OsCOL9* ร่วมกัน ซึ่งจีโนไทป์ของทั้ง 4 เครื่องหมายดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) และสามารถร่วมกันอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอกได้ 61.06% โดยที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* มีผลต่ออายุวันออกดอกมากที่สุด ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -6.47 รองลงมา คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2*, *OsDof12* และ *OsCOL9* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ 5.02, -2.16 และ -1.58 ตามลำดับ ได้สมการทำนาย $\hat{y} = 110.12 - 6.47 RFT1 (x_1) + 5.02 Hd2 (x_2) - 2.16 OsDof12 (x_3) - 1.58 OsCOL9 (x_4)$ แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 4 ตำแหน่ง เหมือนข้าวพันธุ์แม่ กข41 คือ RDRD, RDRD, RDRD และ RDRD อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) เท่ากับ 110.12 วัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2* (x_2), *OsDof12* (x_3) และ *OsCOL9* (x_4) คงที่ และมีแอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* (x_1) เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 6.47 วัน ในทำนองเดียวกัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* (x_1), *OsDof12* (x_3) และ *OsCOL9* (x_4) คงที่ และมีแอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2* (x_2) เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) เพิ่มขึ้น 5.02 วัน แต่เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* (x_1), *Hd2* (x_2) และ *OsDof12* (x_3) คงที่ และมีแอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsCOL9* (x_4) เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 2.16 วัน และเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* (x_1), *Hd2* (x_2) และ *OsDof12* (x_3) คงที่ และมีแอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsCOL9* (x_4) เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 1.58 วัน (Table 6) ดังนั้น ถ้าต้องการให้อายุวันออกดอกสั้นลงต้องคัดเลือกยีน *RFT1*, *OsDof12* และ *OsCOL9* ให้มีแอลลีลเหมือนข้าวพันธุ์แม่ กข41 และคัดเลือกยีน *Hd2* ให้มีแอลลีลเหมือนข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105- PISD

ในขณะเดียวกันภายใต้สภาพวันสั้น พบว่า รูปแบบที่ดีที่สุด คือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1*, *Hd6*, *OsCOL9* และ *OsDof12* ร่วมกัน ซึ่งจีโนไทป์ของทั้ง 4 เครื่องหมาย มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) และสามารถร่วมกันอธิบายความผันแปรของอายุวันออกดอกได้ 44.54% โดยที่จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* มีผลต่ออายุวันออกดอกมากที่สุด ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -2.71 รองลงมา คือ จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd6*, *OsCOL9* และ *OsDof12* ซึ่งมีค่า b เท่ากับ -1.63, -1.40 และ -1.12 ตามลำดับ ได้สมการทำนาย $\hat{y} = 98.71 - 2.71 RFT1 (x_1) - 1.63 Hd6 (x_2) - 1.40 OsCOL9 (x_3) - 1.12 OsDof12 (x_4)$ แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 4 ตำแหน่ง เหมือนข้าวพันธุ์แม่ กข41 คือ RDRD, RDRD, RDRD และ RDRD อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) เท่ากับ 98.71 วัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd6* (x_2), *OsCOL9* (x_3) และ *OsDof12* (x_4) คงที่ และมีแอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* (x_1) เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 2.71 วัน ในทำนองเดียวกัน เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* (x_1), *OsCOL9* (x_3) และ *OsDof12* (x_4) คงที่ และมีแอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd6* (x_2) เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 1.63 วัน แต่เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* (x_1), *Hd6* (x_2) และ *OsDof12* (x_4) คงที่ และมีแอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsCOL9* (x_3) เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 1.40 วัน และเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* (x_1), *Hd2* (x_2) และ *OsCOL9* (x_3) คงที่ และมีแอลลีลจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDof12* (x_4) เพิ่มขึ้น 1 แอลลีล จะทำ

ให้อายุวันออกดอก ($\hat{y}$) สั้นลง 1.12 วัน (Table 6) ดังนั้น ถ้าต้องการให้อายุวันออกดอกสั้นลงต้องคัดเลือกยีน *RFT1*, *Hd6*, *OsCOL9* และ *OsDof12* ให้มีแอลลีลเหมือนข้าวพันธุ์แม่ กข41 ทั้งหมด

Table 6 Multiple regression analysis of the DNA markers located at or linked to the genes and their relationship with heading date of F_2 populations under natural long-day and natural short-day conditions

Molecular markers of genes (x)	Phenotype (heading date), ($\hat{y}$)	Regression models $\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$	SE	R ² (%)	p-value
<i>RFT1</i> (x_1)	Natural long-day (n = 138)	$\hat{y} = 110.12 - 6.47 RFT1 (x_1)$	5.08	61.06	0.000**
<i>Hd2</i> (x_2)		$+5.02 Hd2 (x_2)$			
<i>OsDof12</i> (x_3)		$- 2.16 OsDof12 (x_3)$			
<i>OsCOL9</i> (x_4)		$- 1.58 OsCOL9 (x_4)$			
<i>RFT1</i> (x_1)	Natural short-day (n = 138)	$\hat{y} = 98.71 - 2.71 RFT1 (x_1)$	2.88	44.54	0.000**
<i>Hd6</i> (x_2)		$- 1.63 Hd6 (x_2)$			
<i>OsCOL9</i> (x_3)		$- 1.40 OsCOL9 (x_3)$			
<i>OsDof12</i> (x_4)		$- 1.12 OsDof12 (x_4)$			

** indicating significance at $p < 0.01$, $\hat{y}$ represented the predicted phenotype (heading date), b_0 represented the constant term, b represented the regression coefficient, under natural long-day conditions; x_1 represented the genotype of the DNA marker of the *RFT1* gene, x_2 represented the genotype of the DNA marker of the *Hd2* gene, x_3 represented the genotype of the DNA marker of the *OsDof12* gene, x_4 represented the genotype of the DNA marker of the *OsCOL9* gene and under natural short-day conditions; x_1 represented the genotype of the DNA marker of the *RFT1* gene, x_2 represented the genotype of the DNA marker of the *Hd6* gene, x_3 represented the genotype of the DNA marker of the *OsCOL9* gene, x_4 represented the genotype of the DNA marker of the *OsDof12* gene, SE represented Standard Error, and R^2 represented the coefficient of determination.

วิจารณ์

อายุวันออกดอกของข้าวเป็นลักษณะสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ข้าวมีการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ ลักษณะนี้ถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง และได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะความยาวของช่วงแสง (Zhou et al., 2021) จากงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 20 ตำแหน่ง ที่เป็นส่วนหนึ่งหรือยึดติดกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอายุวันออกดอก (ฟีนไทป์) ของประชากร F_2 ที่เกิดจากผสมของข้าวพันธุ์แม่ กข41 กับข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น และการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA, Pearson correlation, Simple regression และ Multiple regression ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Multiple regression ในประชากร F_2 พบว่า ภายใต้สภาพวันยาว จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1*, *Hd2*, *OsDof12* และ *OsCOL9* และภายใต้สภาพวันสั้น จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1*, *Hd6*, *OsCOL9* และ *OsDof12* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับอายุวันออกดอก ($p < 0.01$) โดยที่เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1*, *Hd6*, *OsDof12* และ *OsCOL9* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับอายุวันออกดอก ยกเว้นเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2* ที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอายุวันออกดอก (Table 6) การวิเคราะห์ด้วยวิธี Multiple regression เป็นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระหลายตัวพร้อมกัน ด้วยการถดถอยทีละขั้น (stepwise regression) เป็นวิธีที่ดีที่สุด ที่ใช้กระบวนการเพิ่ม หรือคัดออกตัวแปรอิสระทีละตัวตามเกณฑ์ทางสถิติ (ประยูรศรี, 2555) ทำให้พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *RFT1*, *Hd2*, *Hd6*, *OsDof12* และ *OsCOL9* มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยภายใต้สภาพวันยาว มีรูปแบบที่ดีที่สุดคือ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* ร่วมกับ *Hd2*, *OsDof12* และ *OsCOL9* ตามลำดับ และภายใต้สภาพวันสั้น รูปแบบที่ดีที่สุดคือ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1* ร่วมกับ *Hd6*, *OsCOL9* และ *OsDof12* ตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2* มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันยาว และจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Hd2* พบว่า แอลลีลของยีน *Hd2* ของข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD พบการกลายพันธุ์แบบ nonsynonymous ในเอ็กซอนที่ 4 ตำแหน่งที่ 29,623,777 มีการแทนที่จากเบส G เป็นเบส A ส่งผลให้กรดอะมิโนลำดับที่ 158 เปลี่ยนจากแอสพาราจีนไปเป็นซีรีน ทำให้ข้าวออกดอกเร็วขึ้น ภายใต้สภาพวันยาว (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li et al. (2018) ที่รายงานว่าพบการกลายพันธุ์ของยีน *Hd2* ที่เกิดจากการแทนที่คู่เบสจากเบส G ไปเป็นเบส A ในเอ็กซอนที่ 4 มีผลต่อการทำงานของยีน *hd2* ส่งผลให้ข้าวออกดอกเร็วขึ้นประมาณ 7–12 วัน ภายใต้สภาพวันยาว จากการวิเคราะห์ Multiple regression ในงานวิจัยนี้ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd2* มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกภายใต้สภาพวันยาว ดังนั้น ถ้าต้องการให้ข้าวในประชากรนี้ออกดอกเร็วขึ้น ต้องคัดเลือกต้นข้าวที่มีแอลลีลของยีน *Hd2* ของข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD อยู่ในสภาพ homozygous

งานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd6* มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับอายุวันออกดอกในประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันสั้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Aryanti et al. (2017) ที่พบว่า ยีน *Hd6* ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการออกดอกของยีน *Hd3a* และยีน *RFT1* ภายใต้สภาพวันยาว และมีหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการออกดอกภายใต้สภาพวันสั้น จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Hd6* ในงานวิจัยนี้ พบว่า แอลลีลของยีน *Hd6* ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 มีการกลายพันธุ์แบบ nonsynonymous ในเอ็กซอนที่ 1 ตำแหน่งที่ 31,514,331 มีการแทนที่จากเบส T เป็นเบส C ส่งผลให้กรดอะมิโนลำดับที่ 4 เปลี่ยนจากอะลานีนไปเป็นวาลีน ทำให้ข้าวออกดอกเร็วขึ้น แต่แอลลีลของยีน *Hd6* ของข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD เป็นเบส T (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li et al. (2018) ที่รายงานว่าพบการกลายพันธุ์ของยีน *Hd6* ที่เกิดจากการแทนที่คู่เบสจากเบส T ไปเป็นเบส C ในเอ็กซอนที่ 1 ส่งผลต่อการทำงานของยีน *hd6* ทำให้ข้าวออกดอกเร็วขึ้นประมาณ 2–3 วัน ภายใต้สภาพวันยาว โดยในงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ Multiple regression พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *Hd6* มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอก ดังนั้น ถ้าต้องการให้ข้าวออกดอกเร็วขึ้นต้องคัดเลือกต้นข้าวที่มีแอลลีลของยีน *Hd6* ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 อยู่ในสภาพ homozygous

ในงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1*, *OsDof12* และ *OsCOL9* มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับอายุวันออกดอก ในประชากร F_2 ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น จากผลการวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบลำดับเบสตำแหน่ง SNPs และ InDel ของยีน *RFT1* เกิดการกลายพันธุ์แบบ nonsynonymous ในเอ็กซอนที่ 4 จำนวน 2 ตำแหน่ง โดยพบแอลลีลของข้าวพันธุ์แม่ กข41 เป็นเบส G และแอลลีลของข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD เป็นเบส A (Table 2) สอดคล้องกับการศึกษาของ Ogiso-Tanaka et al. (2013) พบแอลลีลของยีน *RFT1* ที่ทำงานบกพร่องในข้าว *indica* พันธุ์ Nona Bokra ที่ออกดอกช้าภายใต้สภาพวันยาว เกิดจากการแทนที่คู่เบสจากเบส G ไปเป็นเบส A ในเอ็กซอนที่ 4 ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลทำให้ยีน *RFT1* ทำงานบกพร่อง ทำให้ข้าว Nona Bokra ออกดอกช้าภายใต้สภาพวันยาว ชี้ให้เห็นว่ายีน *RFT1* เป็นยีนหลักที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการออกดอกภายใต้สภาพวันยาว ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดช่วงเวลาการออกดอกของข้าวในแต่ละสภาพแวดล้อม (Komiya et al., 2008; Tsuji et al., 2008) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้หากต้องการให้ข้าวมีอายุวันออกดอกสั้นลงต้องคัดเลือกให้ข้าวอยู่ในสภาพ homozygous ของแอลลีลของยีน *RFT1* ที่จะได้มาจากข้าวพันธุ์แม่ กข41 ซึ่งมีอายุวันออกดอกสั้นกว่า

ในขณะเดียวกันในงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDof12* เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสตำแหน่ง snp และอินเดล ของยีน *OsDof12* พบการกลายพันธุ์แบบ nonsynonymous ในเอ็กซอนที่ 2 ตำแหน่งที่ 3,740,799 โดยพบแอลลีลของข้าวพันธุ์แม่ กข41 เป็นเบส G ทำให้ออกดอกเร็วกว่าข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML105-PISD ที่เป็นเบส C ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น (Table 1, Table 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang et al. (2020) ที่วิเคราะห์กลุ่มยีน *Dof* มีการตอบสนองกับวันออกดอกที่หลากหลายภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น โดยใช้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ haplotype-based association ภายใต้สภาพวันยาวที่วู้ฮั่น และสภาพวันสั้นที่ไทหนาน จากทั้งหมด 16 ยีน พบยีน *OsDof12* ในสายพันธุ์ japonica ทำงานหลักภายใต้สภาพวันยาว นอกจากนี้ยีนกลุ่ม *Dof* แปรผลเป็น

โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด Dof (DNA binding with one finger) มีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโต และทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการออกดอกของข้าว หากมีการแสดงออกมากเกินไป (overexpress) จะทำให้ข้าวออกดอกได้ภายใต้สภาพวันยาว (Wu et al., 2015) ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่า แอลลีลของยีน *OsDof12* เมื่ออยู่ในสภาพ homozygous ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ทำให้ข้าวออกดอกเร็วขึ้นได้ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Multiple regression พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsCOL9* ทำให้ข้าวออกดอกเร็วขึ้นเมื่อคัดเลือกให้แอลลีลของยีน *OsCOL9* อยู่ในสภาพ homozygous ของข้าวพันธุ์แม่ กข41 (Table 6) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu et al., (2016) พบว่า ข้าวสายพันธุ์ปกติ (wild-type) ที่มียีนเด่น *OsCOL9* ทำให้ข้าวออกดอกช้า โดยมีค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอกเท่ากับ 62 วัน ภายใต้สภาพวันสั้น และ 71 วัน ภายใต้สภาพวันยาว ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ *oscol9-ko* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ยีน *OsCOL9* สูญเสียหน้าที่ (loss-of-function) มีค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอกเร็วขึ้นประมาณ 7 วัน เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ปกติทั้งภายใต้สภาพวันสั้น ภายใต้สภาพวันยาว

สรุป

การศึกษาอายุวันออกดอกของข้าวพันธุ์แม่ กข41 ภายใต้สภาพวันยาว มีอายุวันออกดอกเฉลี่ย 97.30 ± 1.78 วัน และภายใต้สภาพวันสั้น อายุวันออกดอกเฉลี่ย 88.26 ± 1.50 วัน และพันธุ์พ่อ คือ KDML 105-PISD ภายใต้สภาพวันยาว มีอายุวันออกดอกเฉลี่ย 103.60 ± 2.94 วัน และภายใต้สภาพวันสั้น อายุวันออกดอกเฉลี่ย 90.93 ± 1.17 วัน ซึ่งข้าวทั้ง 2 พันธุ์มีค่าเฉลี่ยของอายุวันออกดอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงนำมาสร้างเป็นประชากร F_2 สำหรับใช้ในการศึกษา ซึ่งพบว่า ประชากร F_2 ภายใต้สภาพวันยาว มีอายุวันออกดอกเฉลี่ย 104.92 ± 8.01 วัน และภายใต้สภาพวันสั้น อายุวันออกดอกเฉลี่ย 91.39 ± 3.80 วัน

ในงานวิจัยนี้ ได้อ่านลำดับเบสทั้งจีโนมของข้าวพันธุ์แม่ กข41 และสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD และนำลำดับเบสในส่วนของเอ็กซอน และโปรโมเตอร์ของยีนในวิธีการควบคุมอายุวันออกดอกข้าวจำนวน 56 ตำแหน่งมาเปรียบเทียบหาตำแหน่งที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่ และพันธุ์พ่อ ทำการค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่ง หรือยึดติดกับยีนได้ 20 ตำแหน่งที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous และ heterozygous ของแอลลีลระหว่างพันธุ์แม่ และพันธุ์พ่อได้ จึงนำมาใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากร F_2 จำนวน 138 กอ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะอายุวันออกดอกด้วยวิธี Simple regression พบว่า ภายใต้สภาพวันยาว จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ *RFT1*, *Hd3a*, *Hd6*, *OsPhyC*, *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsDof12*, *SDG711*, *Hd1* และ *Hd2* กับอายุวันออกดอกมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และภายใต้สภาพวันสั้น จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน 11 ตำแหน่ง ได้แก่ *RFT1*, *Hd3a*, *Hd6*, *OsPhyC*, *OsCOL9*, *OsPhyA*, *OsDof12*, *SDG711*, *Hd1*, *Ehd2* และ *OsVIL2* กับอายุวันออกดอกมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกดังกล่าวมาวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณด้วยวิธี Multiple regression พบว่า รูปแบบที่ดีที่สุด ภายใต้สภาพวันยาว คือ การใช้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1*, *Hd2*, *OsDof12* และ *OsCOL9* ร่วมกัน มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถอธิบายความผันแปร (R^2) ของอายุวันออกดอกสั้นได้ 61.06% ขณะที่ภายใต้สภาพวันสั้น คือ การใช้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *RFT1*, *Hd6*, *OsCOL9* และ *OsDof12* ร่วมกัน มีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า R^2 เท่ากับ 44.54% ดังนั้น การคัดเลือกแอลลีลที่เหมาะสมของยีน 5 ตำแหน่ง *RFT1*, *Hd2*, *Hd6*, *OsDof12* และ *OsCOL9* สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีอายุวันออกดอกสั้นในประชากรที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์แม่ กข41 และ ข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD ต้องคัดเลือกให้ยีน *RFT1*, *Hd6*, *OsDof12* และ *OsCOL9* เป็น homozygous ของแอลลีลข้าวพันธุ์แม่ กข41 ส่วน *Hd2* ต้องคัดเลือกให้เป็น homozygous ของแอลลีลข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD จึงจะทำให้ข้าวมีอายุวันออกดอกสั้นลง ทั้งภายใต้สภาพวันยาวและสภาพวันสั้น

ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่สัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นจะถูกใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง ข้าวพันธุ์แม่ กข41 และข้าวสายพันธุ์พ่อ KDML 105-PISD เพื่อคัดเลือกให้ข้าวมี

อายุวันออกดอกสั้นลง และสามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ได้ นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะ เป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนางานปรับปรุงพันธุ์ข้าว หรือพืชอื่น ๆ ได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์ปรับปรุงพันธุ์ข้าว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์ให้ข้อมูลและสารเคมีในการทำ การวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กองวิจัย และพัฒนากกรมการข้าว. 2559. พันธุ์ข้าว. แหล่งข้อมูล: <http://webold.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=121.htm>. ค้นเมื่อ 7 มีนาคม 2568.
- ปฐมพร อินชนบท, ยุพเยาว์ คบพิมาย, กฤษณะ ลานน้ำเที่ยง และวราภรณ์ แสงทอง. 2567. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับ อายุวันออกดอกสั้นในประชากร F_2 ของพันธุ์ข้าว กข79 กับสายพันธุ์ กข43 ข้าวเหนียวหอม. วารสารแก่นเกษตร. 52: 321-340.
- ประยูรศรี บุตรแสนคม. 2555. การคัดเลือกตัวแปรพยากรณ์เข้าในสมการถดถอยพหุคูณ. แหล่งข้อมูล: [file:///C:/Users/Acer/Downloads/chitpon,+Journal+manager,+242%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Acer/Downloads/chitpon,+Journal+manager,+242%20(3).pdf). ค้นเมื่อ 16 มีนาคม 2568.
- วราภรณ์ แสงทอง, ศุภางค์ ทิพย์พิทักษ์, วิลาวรรณ ศิริพูนวิวัฒน์, ประทีป พินตานนท์, สมเกียรติ วัฒนวิรัตน์ และณลินี รุ่งเรืองศรี. 2551. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อคัดเลือกแอลลีล *Hd1* ของข้าวพันธุ์ กข 6 และ แอลลีล *hd1* ของข้าวพันธุ์ Taichung 65. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 26: 37-47.
- ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท. 2565. กข95 (ดกเจ้าพระยา). แหล่งข้อมูล: <https://cnt-rrc.ricethailand.go.th/page/18749>. ค้นเมื่อ 19 พฤษภาคม 2568.
- ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท. 2567. ข้าวขาวพื้นแข็ง กข107. แหล่งข้อมูล: <https://cnt-rsc.ricethailand.go.th/page/48296>. ค้นเมื่อ 19 พฤษภาคม 2568.
- สมาคมดาราศาสตร์ไทย. 2564. เวลาดวงอาทิตย์ และดวงจันทร์ขึ้น-ตก พ.ศ. 2564 - จังหวัดเชียงใหม่. แหล่งข้อมูล: <https://thaiastro.nectec.or.th/skyevnt/sunmoon/2021/chiangmai.html>. ค้นเมื่อ 7 มีนาคม 2568.
- สำนักงานนโยบาย และยุทธศาสตร์การค้า กระทรวงพาณิชย์. 2567. การศึกษาแนวทางการสร้างเสถียรภาพการค้าสินค้าข้าว. แหล่งข้อมูล: <https://uploads.tps.go.th/67-การศึกษาแนวทางการสร้างเสถียรภาพการค้าสินค้าข้าว%20กษ.pdf>. ค้นเมื่อ 7 มีนาคม 2568.
- สุชาติ นักปราชญ์, สุนิยม ตาปราบ, โอภาส วรราช, กษิณ ขำละชะสิงห์, สุรินทร์ ไตรดีลันนท์, สาธิต ทยาพัชร, ลือชัย อารยะรังษฤษฎ์, เกษม สุนทรจารย์, วาสนา พันธุ์เพ็ง, กิ่งแก้ว คุณเขต, กัญญา เชื้อพันธุ์, สุนันทา วงศ์ปิยะชน, สุภาวิณี แสงโชติ, อภิชาติ ลาวัณย์ประเสริฐ, อุดลย์ ฤทธะดี, เฉลิมชาติ ฤไชยคาม, สุภาพร จันทร์บัวทอง, อัญชลี ประเสริฐศักดิ์, สุรพล จิตพร, รชฎ พันธุ์พิทยแพทย์, กาญจนา กล้าแข็ง, สมหมาย ศรีวิสุทธิ, บังอร ธรรมสามิสรณ์, สุรพงศ์ โพธิพิบูลย์ และนิตยา รื่นสุข. 2552. SPR99007-22-1-2-2-1 สายพันธุ์ข้าวอายุสั้นสำหรับนาชลประทาน. น. 11-19. ใน: ประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2552. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.
- สุภมาส อังศุโชติ. 2556. การวิเคราะห์ข้อมูลวิจัยเพื่อพัฒนาการเรียนการสอน. เจริญดีมั่นคงการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- Aryanti, A., I. Dwimahyani, and I. Ishak. 2017. Identification of *heading date six (Hd6)* gene derived from rice mutant varieties. Biosaintifika: Journal of Biology and Biology Education. 9: 105-113.
- Bocianowski, J. 2012. The use of weighted multiple linear regression to estimate QTL-by-QTL epistatic effects. Genetics and Molecular Biology. 35: 802-809.

- Cai, M., S. Chen, M. Wu, T. Zheng, L. Zhou, C. Li, H. Zhang, J. Wang, X. Xu, J. Chai, Y. Ren, X. Guo, X. Zhang, C. Lei, Z. Cheng, J. Wang, L. Jiang, H. Zhai, H. Wang, S. Zhu, and J. Wan. 2019. *Early heading 7* interacts with *DTH8*, and regulates flowering time in rice. *Plant Cell Reports*. 38: 521-532.
- Chardon, F., and C. Damerval. 2005. Phylogenomic analysis of the *PEBP* gene family in cereals. *Journal of Molecular Evolution*. 61: 579-590.
- Conrad, L. J., I. Khanday, C. Johnson, E. Guiderdoni, G. An, U. Vijayraghavan, and V. Sundaresan. 2014. The polycomb group gene *EMF2B* is essential for maintenance of floral meristem determinacy in rice. *The Plant Journal*. 80: 883-894.
- Doi, K., T. Izawa, T. Fuse, U. Yamanouchi, T. Kubo, Z. Shimatani, M. Yano, and A. Yoshimura. 2004. *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT-like* gene expression independently of *Hd1*. *Genes & Development*. 18: 926-936.
- Du, A., W. Tian, M. Wei, W. Yan, H. He, D. Zhou, X. Huang, S. Li, and X. Ouyang. 2017. The *DTH8-Hd1* module mediates day-length-dependent regulation of rice flowering. *Molecular plant*. 10: 948-961.
- Fujino, K., U. Yamanouchi, and M. Yano. 2013. Roles of the *Hd5* gene controlling heading date for adaptation to the northern limits of rice cultivation. *Theoretical and Applied Genetics*. 126: 611-618.
- Gao, H., M. Jina, X. M. Zhenga, J. Chena, D. Yuanc, Y. Xinc, M. Wangd, D. Huang, Z. Zhanga, K. Zhou, P. Shenga, J. Maa, W. Maa, H. Dengc, L. Jiangb, S. Liub, H. Wanga, C. Wua, L. Yuanc, and J. Wana. 2014. Days to heading 7, a major quantitative locus determining photoperiod sensitivity and regional adaptation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111: 16337-16342.
- Griffiths, S., R. P. Dunford, G. Coupland, and D. A. Laurie. 2003. The evolution of *CONSTANS-like* gene families in barley, rice, and Arabidopsis. *Plant Physiology*. 131: 1855-1867.
- Hagiwara, W. E., N. Uwatoko, A. Sasaki, K. Matsubara, H. Nagano, K. Onishi, and Y. Sano. 2009. Diversification in flowering time due to tandem *FT-like* gene duplication, generating novel Mendelian factors in wild and cultivated rice. *Molecular Ecology*. 18: 1537-1549.
- Han, S. H., S. C. Yoo, B. Doo Lee, G. An, and N. C. Paek. 2015. Rice FLAVINBINDING, *KELCH REPEAT*, *F-BOX 1* (*OsFKF1*) promotes flowering independent of photoperiod. *Plant, Cell & Environment*. 38: 2527-2540.
- Hayama, R., S. Yokoi, S. Tamaki, M. Yano, and K. Shimamoto. 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*. 422: 719-722.
- Hori, K., E. O. Tanaka, K. Matsubara, U. Yamanouchi, K. Ebana, and M. Yano. 2013. *Hd16*, a gene for casein kinase I, is involved in the control of rice flowering time by modulating the day-length response. *The Plant Journal*. 76: 36-46.
- Huang, Y., Z. Han, N. Cheng, M. Luo, X. Bai, and Y. Xing. 2020. Minor effects of 11 *Dof* family genes contribute to the missing heritability of heading date in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*. 10: 1739.
- Ishikawa, R., M. Aoki, K. Kurotani, S. Yokoi, T. Shinomura, M. Takano, and K. Shimamoto. 2011. Phytochrome B regulates *Heading date 1* (*Hd1*)-mediated expression of rice florigen *Hd3a* and critical day length in rice. *Molecular Genetics and Genomics*. 285: 461-470.

- Itoh, H., Y. Tanaka, and T. Izawa². 2019. Genetic relationship between phytochromes and *OsELF3-1* reveals the mode of regulation for the suppression of phytochrome signaling in rice. *Plant and Cell Physiology*. 60: 549-561.
- Jiang, P., S. Wang, H. Jiang, B. Cheng, K. Wu, and Y. Dinga. 2018. The COMPASS-like complex promotes flowering and panicle branching in rice. *Plant Physiology*. 176: 2761-2771.
- Kim, S. L., S. Lee, H. J. Kim, H. G. Nam, and G. An. 2007. *OsMADS51* is a short-day flowering promoter that functions upstream of *Ehd1*, *OsMADS14*, and *Hd3a*. *Plant Physiology*. 145: 1484-1494.
- Kim, S. K., C. H. Yun, J. H. Lee, Y. H. Jang, H. Y. Park, and J. K. Kim. 2008. *OsCO3*, a *CONSTANS-LIKE* gene, controls flowering by negatively regulating the expression of *FT-like* genes under SD conditions in rice. *Planta*. 228: 355-365.
- Kojima, S., Y. Takahashi, Y. Kobayashi, L. Monna, T. Sasaki, T. Araki, and M. Yano. 2002. *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant and Cell Physiology*. 43: 1096-1105.
- Komiya R., A. Ikegami, S. Tamaki, S. Yokoi, and K. Shimamoto. 2008. *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. *Development*. 135: 767-774.
- Komiya, R., S. Yokoi, and K. Shimamoto. 2009. A gene network for long-day flowering activates *RFT1* encoding a mobile flowering signal in rice. *Development*. 136: 3443-3450.
- Koo, B. H., S. C. Yooa, J. W. Parka, C. T. Kwona, B. D. Leea, G. Anb, Z. Zhangc, J. Lic , Z. Lic, and N. C. Paeka. 2013. Natural variation in *OsPRR37* regulates heading date and contributes to rice cultivation at a wide range of latitudes. *Molecular Plant*. 6: 1877-1888.
- Lee, S., J. Kim, J. J. Han, M. J. Han, and G. An. 2004. Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20) ortholog in rice. *The Plant Journal*. 38: 754-764.
- Lee, Y. S., and G. An. 2015. Complex regulatory networks of flowering time in rice. *Rice Research*. 3: 23.
- Lee, Y. S., D. H. Jeong, D. Y. Lee, J. Yi, C. H. Ryu, S. L. Kim, and G. An. 2010. *OsCOL4* is a constitutive flowering repressor upstream *Ehd1* and downstream of *OsphyB*. *The Plant Journal*. 63: 18-30.
- Lee, Y. S., J. Yi, and G. An. 2016. OsPhyA modulates rice flowering time mainly through OsGI under short days and Ghd7 under long days in the absence of phytochrome B. *Plant Molecular Biology*. 91: 413-427.
- Li, D., C. Yang, X. Li, Q. Gan, X. Zhao, and L. Zhu. 2009. Functional characterization of rice OsDof12. *Planta*. 229 :1159-1169.
- Li, X., Y. Sun, X. Tian, Y. Ren, J. Tang, Z. Wang, Y. Cheng, and Q. Bu. 2018. Comprehensive identification of major flowering time genes and their combinations, which determined rice distribution in Northeast China. *Plant Growth Regulation*. 84: 593-602.
- Lin, H. X., T. Yamamoto, T. Sasaki, and M. Yano. 2000. Characterization and detection of epistatic interactions of three QTLs, *Hd1*, *Hd2* and *Hd3*, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 1021-1028.

- Liu, H., S. Dong, D. Sun, W. Liu, F. Gu, Y. Liu, T. Guo, H. Wang, J. Wang, and Z. Chen. 2016. CONSTANS-like 9 (*OsCOL9*) interacts with receptor for activated C-kinase 1 (*OsRACK1*) to regulate blast resistance through salicylic acid and ethylene signaling pathways. *Public Library of Science ONE*. 11: e0166249.
- Liu, K., Y. Yu, A. Dong, and W. H. Shen. 2017. SET DOMAIN GROUP701 encodes a H3K4-methyltransferase and regulates multiple key processes of rice plant development. *New Phytologist*. 215: 609–623.
- Liu, X., C. Zhou, Y. Zhao, S. Zhou, and W. Wang. 2014. The rice enhancer of zeste [E(z)] genes *SDG711* and *SDG718* are respectively involved in long day and short day signaling to mediate the accurate photoperiod control of flowering time. *Frontiers in Plant Science*. 5: 591.
- Matsubara, K, U. Yamanouchi, Z. X. Wang, Y. Minobe, and T. Izawa. 2008. *Ehd2*, a rice ortholog of the maize *INDETERMINATE1* gene, promotes flowering by up-regulating *Ehd1*. *Plant Physiology*. 148: 1425-1435.
- Matsubara, K., U. Yamanouchi, Y. Nonoue, K. Sugimoto, Z. X. Wang, Y. Minobe, and M. Yano. 2011. *Ehd3*, encoding a plant homeodomain finger-containing protein, is a critical promoter of rice flowering. *The Plant Journal*. 66: 603–612.
- Monna L, X. Lin, S. Kojima, T. Sasaki, and M. Yano .2002. Genetic dissection of a genomic region for a quantitative trait locus, *Hd3*, into two loci, *Hd3a* and *Hd3b*, controlling heading date in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 104: 772–778.
- Murakami, M., A. Matsushika, M. Ashikari, T. Yamashino, and T. Mizuno. 2005. Circadian-associated rice pseudo response regulators (*Os PRRs*): insight into the control of flowering time. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 69: 410-414.
- Nemoto, Y., Y. Nonoue, M. Yano, and T. Izawa. 2016. *Hd1*, a CONSTANS ortholog in rice, functions as an *Ehd1* repressor through interaction with monocot-specific CCT-domain protein *Ghd7*. *The Plant Journal*. 86: 221-233.
- Ng, D. W., T. Wang, M. B. Chandrasekharan, R. Aramayo, and S. Kerbundit. 2007. Plant SET domain-containing proteins: Structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1769: 316-329.
- Ogiso-Tanaka, E., K. Matsubara, S. Yamamoto, Y. Nonoue, J. Wu, H. Fujisawa, H. Ishikubo, T. Tanaka, T. Ando, T. Matsumoto, and M. Yano. 2013. Natural variation of the *RICE FLOWERING LOCUS T 1* contributes to flowering time divergence in rice. *Public Library of Science ONE*. 8: e75959.
- Panahi, B., H. M. Jalaly, and R. Hamid. 2024. Using the next-generation sequencing approach for the discovery and characterization of molecular plant markers. *Current Plant Biology*: 100412.
- Park, S. J., S. L. Kim, S. Lee, B. I. Je, and H. L. Piao. 2008. *Rice Indeterminate 1 (OsId1)* is necessary for the expression of *Ehd1* (*Early heading date 1*) regardless of photoperiod. *The Plant Journal*. 56: 1018-1029.
- Peng, L. T., Z. Y. Shi, L. Li, G. Z. Shen, and J. L. Zhang. 2007. Ectopic expression of *OsLFL1* in rice represses *Ehd1* by binding on its promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 360: 251-256.
- Peng, L. T., Z. Y. Shi, L. Li, G. Z. Shen, and J. L. Zhang. 2008. Overexpression of transcription factor *OsLFL1* delays flowering time in *Oryza sativa*. *Journal of Plant Physiology*. 165: 876-885.
- Qin, F. J., Q. W. Sun, L. M. Huang, X. S. Chen, and D. X. Zhou. 2010. Rice SUVH histone methyltransferase genes display specific functions in chromatin modification and retrotransposon repression. *Molecular Plant*. 3:773–782.

- Ryu, C. H., S. Lee, L. H. CHO, S. L. Kim, Y. S. LEE, S. C. Choi, and G. An. 2009. *OsMADS50* and *OsMADS56* function antagonistically in regulating long day (LD)-dependent flowering in rice. *Plant, Cell & Environment*. 32: 1412-1427.
- Shibaya T, K. Hori, E. Ogiso-Tanaka, U. Yamanouchi, K. Shu, N. Kitazawa, A. Shomura, T. Ando, K. Ebana, J. Wu, T. Yamazaki, and M. Yano. 2016. *Hd18*, Encoding histone acetylase related to Arabidopsis FLOWERING LOCUS D, is involved in the control of flowering time in rice. *Plant Cell Physiology*. 57: 1828–1838.
- Sui, P., J. Jin, S. Ye, C. Mu, J. Gao, H. Feng, W. H. Shen, Y. Yu, and A. Dong. 2012. H3K36 methylation is critical for brassinosteroid-regulated plant growth and development in rice. *The Plant Journal*. 70: 340–347.
- Sun, C. H., J. Fang, T. L. Zhao, B. Xu, F. T. Zhang, L. C. Liu, J. Y. Tang, G. F. Zhang, X. J. Deng, F. Chen, Q. Qian, X. F. Cao, and C. C. Chu. 2012. The histonemethyl transferase *SDG724* mediates H3K36me2/3 deposition at *MADS50* and *RFT1* and promotes flowering in rice. *The Plant Cell*. 24: 3235–3247.
- Takahashi, Y., A. Shomura, T. Sasaki, and M. Yano. 2001. *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 7922-7927.
- Takano, M., N. Inagaki, X. Xie, N. Yuzurihara, F. Hihara, T. Ishizuka, M. Yano, M. Nishimura, A. Miyao, and H. Hirochika. 2005. Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *The Plant Cell*. 17: 3311-3325.
- Tanaka, N., M. Shenton, Y. Kawahara, M. Kumagai, H. Sakai, H. Kanamori, J. Yonemaru, S. Fukuoka, K. Sugimoto, and M. Ishimoto. 2020. Whole-genome sequencing of the NARO World Rice Core Collection (WRC) as the basis for diversity and association studies. *Plant and Cell Physiology*. 61: 922-932.
- Terauchi, R., A. Abe, H. Takagi, K. Yoshida, S. Kosugi, S. Natsume, and M. Tamiru. 2012. Whole genome sequencing and future breeding of rice. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 21: 10-14.
- Tsuji, H., S. Tamaki, R. Komiya, and K. Shimamoto. 2008. Florigen and the photoperiodic control of flowering in rice. *Rice*. 1: 25-35.
- Vergard, B. S., and T. T. Chang. 1985. The flowering response of the rice plant to photoperiod a review of the literature. 4th edition. The International Rice Research Institute, Los Banos Laguna, Philippines.
- Wei, H., X. Wang, H. Xu, and L. Wang. 2020. Molecular basis of heading date control in rice. *Abiotech*. 1: 219-232.
- Wei, X., J. Xu, H. Guo, L. Jiang, S. Chen, and C. Yu. 2010. *DTH8* suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously. *Plant Physiology*. 153: 1747-1758.
- Wu, C. Y., C. J. You, C. S. Li, T. Long, and G. X. Chen. 2008. *RID1*, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105: 12915-12920.
- Wu, Q., D. Li, D. Li, X. Liu, X. Zhao, X. Li, and L. Zhu. 2015. Overexpression of *OsDof12* affects plant architecture in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*. 6: 833.
- Xie, S., M. Chen, R. Pei, Y. Quyang, and J. Yao. 2015. *OsEMF2b* acts as a regulator of flowering transition and floral organ identity by mediating H3K27me3 deposition at *OsLFL1* and *OsMADS4* in rice. *Plant Molecular Biology Reporter*. 33: 121-132.

- Xue, W., Y. Xing, X. Weng, Y. Zhao, W. Tang, L. Wang, H. Zhou, S. Yu, C. Xu, X. Li, and Q. Zhang. 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nature Genetics*. 40: 761-767.
- Yan, W., H. Liu, X. Zhou, Q. Li, J. Zhang, L. Lu, T. Liu, H. Liu, C. Zhang, and Z. Zhang, 2013. Natural variation in *Ghd7.1* plays an important role in grain yield and adaptation in rice. *Cell Research*. 23: 969-971.
- Yang, J., S. Lee, R. Hang, S. R. Kim, and Y. S. Lee. 2013a. *OsVIL2* functions with PRC2 to induce flowering by repressing *OsLFL1* in rice. *The Plant Journal*. 73: 566-578.
- Yang, Y., Q. Peng, G. X. Chen, X. H. Li, and C. Y. Wu. 2013b. *OsELF3* is involved in circadian clock regulation for promoting flowering under long-day conditions in rice. *Molecular Plant*. 6: 202-215.
- Yano, M., and T. Sasaki. 1997. Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. *Oryza: from molecule to plant*. *Plant Molecular Biology*. 35: 145-153.
- Zhang, H., S. Zhu, T. Liu, C. Wang, Z. Cheng, X. Zhang, and J. Wan. 2019. *DELAYED HEADING DATE 1* interacts with *OSHAP5C/D*, delays flowering time and enhances yield in rice. *Plant Biotechnology Journal*. 17: 531-539.
- Zhao, X. L., Z. Y. Shi, L. T. Peng, G. Z. Shen, and J. L. Zhang. 2011. An atypical HLH protein *OsLF* in rice regulates flowering time and interacts with *OsPIL13* and *OsPIL15*. *New Biotechnology*. 28: 788-797.
- Zhao, J. M., X. Huang, X. H. Ouyang, W. L. Chen, A. P. Du, L. Zhu, S. G. Wang, X. W. Deng, and S. G. Li. 2012. *OsELF3-1*, an ortholog of *Arabidopsis early flowering 3*, regulates rice circadian rhythm and photoperiodic flowering. *Public Library of Science ONE*. 7: e43705.
- Zhou, S., Z. Shanshan, C. Song, H. Haigang, W. Haoqin, H. Benyuan, C. Liang, X. Zhuang, L. Linglong, J. Ling, W. Haiyang, and W. Jianmin. 2021. Transcriptional and posttranscriptional regulation of heading date in rice. *New Phytologist*. 230: 943-956.
- Zhu, C. M., Q. Peng, D. B. Fu, D. X. Zhuang, Y. M. Yu, M. Duan, W. B. Xie, Y. H. Cai, Y. D. Ouyan, X. M. Lian, and C. Y. Wu. 2018. The E3 ubiquitin ligase HAF1 modulates circadian accumulation of *EARLY FLOWERING3* to control heading date in rice under long-day conditions. *The Plant Cell*. 30: 2352-2367.
- Zhu, S., J. Wang, M. Cai, H. Zhang, F. Wu, Y. Xu, C. Li, Z. Cheng, X. Zhang, and X. Guo. 2017. The OsHAPL1-DTH8-Hd1 complex functions as the transcription regulator to repress heading date in rice. *Journal of Experimental Botany*. 68: 553-568.