วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 30:1 (43-54)

การหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว

Identification of Molecular Markers Linked to *Gn1a*, *SPP1* and *Ghd7* Genes Related to Grain Number Per Panicle in Rice by Using F_2 Population of a Cross Between RD6 and Paet Rio

ดวงใจ กิ่งโพธิ์[1] วราภรณ์ แสงทอง[2] ประวิตร พุทธานนท์[3] วัลลา ดิฐพงษ์พิชญ์[4]

บทคัดย่อ

จำนวนเมล็ดต่อรวงเป็นลักษณะสำคัญในองค์ประกอบผลผลิตที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตข้าว จากการรวบรวมเชื้อพันธุกรรมข้าวพบว่าข้าวพันธุ์แนะนำในประเทศไทยมีจำนวนเมล็ดต่อรวงโดยเฉลี่ยน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวพื้นเมือง การเพิ่มผลผลิตของข้าวพันธุ์แนะนำสามารถทำได้โดยปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มมากขึ้น โดยใช้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากเป็นพันธุ์ให้ ดังนั้นจำเป็นต้องหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดหรืออยู่ใกล้กับยีนที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงเพื่อช่วยในการคัดเลือก ได้แก่ ยีน *Gn1a* (grain number per panicle) ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ยีน *SPP1* (spikelet number per panicle) ควบคุมลักษณะจำนวนดอกย่อยต่อช่อดอก และยีน *Ghd7* ควบคุมลักษณะสำคัญ ได้แก่ จำนวนเมล็ดต่อรวง (yield) ความสูงของต้น (plant height) และวันออกดอก (heading date) โดยศึกษาในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้ว จำนวน 100 ต้น พบว่าเครื่องหมาย RM10318, RM10395 และ RM21335 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR marker ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ โดยแต่ละเครื่องหมาย SSR marker อยู่ใกล้กับยีนทั้งสามนี้ที่ระยะ 86,553 10,202 และ 76,610 เบส ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับแต่ละยีนกับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี single regression พบว่าแต่ละเครื่องหมายมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง มีค่า R-square เท่ากับ 0.0829, 0.0953 และ 0.0830 มีค่าระดับนัยสำคัญ (P-value) เท่ากับ 0.015, 0.0077 และ 0.0149 ตามลำดับ จากนั้นจึงวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง พบว่าเครื่องหมาย RM10395 ที่ยึดติดกับยีน *SPP1* มีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0949 และมีค่า P-value เท่ากับ 0.0018 เป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่าเครื่องหมาย RM10318 กับ RM21335 ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a* และ ยีน *Ghd7*

คำสำคัญ : ข้าว, จำนวนเมล็ดต่อรวง, เครื่องหมายโมเลกุล, SSR marker

Abstract

Grain number per panicle is an important component of rice yield. Recommended Thai rice cultivars generally have small grain number per panicle compared to Thai local rice cultivars so, yielding of the recommended Thai rice cultivars would increase by increasing the grain number per panicle. Thus, identification of molecular markers linked to a QTL that related to increase grain productivity would

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290
[2] สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290
[3] สาขาวิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290
[4] บริษัท ฮอทิเจนเนติคส์ รีเสริช์ (เอส. อี. เอเชีย) จำกัด จ. เชียงใหม่ 50290

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

enhance the rice improvement program. Interest genes are including grain number per panicle (*Gn1a*), spikelet number per panicle (*SPP1*) and pleiotropic gene (*Ghd7)* effect on yield, plant height and heading date. Using 100 plants of F_2 population derived from a cross between RD 6 and Paet Rio, the SSR markers; RM10318, RM10395 and RM21335 were identified as linked to genes; *Gn1a, SPP1* and *Ghd7,* respectively with distance from each gene were 86,553 10,202 and 76,610 bases, respectively. QTLs analysis via the single regression method, the result showed that these three markers which tightly linked to each gene correlated to grain number per panicle trait. The R-square of RM10318, RM10395 and RM21335 were 0.0829, 0.0953 and 0.0830 (*P*-value = 0.015, 0.0077 and 0.0149, respectively). Afterward, data were analyzed with multiple regression method, result showed that RM10395 which linked to *SPP1* gene correlated to grain number per panicle, which partial R-square was 0.0949 and P-value equal was 0.0018.

Keyword : rice, grain number per panicle, molecular marker, SSR marker

คำนำ

จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่าพันธุ์ข้าวไทยที่เกษตรกรนิยมปลูกมีจำนวนเมล็ดต่อรวงโดยเฉลี่ยน้อย เช่น ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ยเท่ากับ 207 เมล็ด และข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 มี 133 เมล็ด (กรมวิชาการเกษตร, 2543) การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ปริมาณผลผลิตต่อไร่สูงขึ้น จากการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองพบว่ามีข้าวพันธุ์พื้นเมืองหลายพันธุ์ที่มีศักยภาพให้จำนวนเมล็ดต่อรวงมาก จึงทำการศึกษาจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์พื้นเมือง และข้าวพันธุ์ต่างๆ รวมทั้งหมด 43 พันธุ์ เพื่อคัดเลือกสำหรับใช้เป็นพันธุ์ให้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต และใช้ข้าวพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกเป็นพันธุ์รับ (recurrent parent) ปรับปรุงด้วยวิธีผสมกลับ (backcross) จากการศึกษา QTLs (quantitative trait loci) ที่ควบคุมลักษณะของผลผลิตข้าว ได้แก่ ยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง (grain number; *Gn*) พบว่ามีจำนวน 5 ตำแหน่ง โดยยีน *Gn1* บนโครโมโซมที่ 1 มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนเมล็ดข้าวต่อรวงมากที่สุด ประกอบด้วยยีน *Gn1a* และ *Gn1b* จากการศึกษาลำดับเบสของยีน *Gn1a* พบว่าเป็นยีนที่ผลิตฮอร์โมนไซโตไคนิน ออกซิเดส/ดีไฮโดรจีเนส (*OsCKX2*) มีหน้าที่ช่วยในการแบ่งเซลล์ รวมถึงการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ (Mok and Mok, 1994) เมื่อมีการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *OsCKX2* ระหว่างข้าวพันธุ์ Habataki และ 5150 ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกับพันธุ์ Koshihikari ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อย พบว่าในข้าวพันธุ์ Habataki มีลำดับเบสขาดหายไปในบริเวณ 5'-untranslated region และมีการเปลี่ยนแปลงของเบสในบริเวณ exon 1 และ 4 นอกจากนี้ยังพบว่ามีลำดับเบสขาดหายไปในบริเวณ exon 3 ของข้าวพันธุ์ 5150 เป็นสาเหตุให้เกิด premature stop codon ของยีน *OsCKX2* ส่งผลให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก เมื่อสร้างข้าวสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ Koshihikari ที่มียีน *Gn1* (NIL-*Gn1*) ซึ่งได้รับจากข้าวพันธุ์ Habataki สามารถให้จำนวนเมล็ดต่อรวงได้มากกว่าข้าวพันธุ์ Koshihikari เดิมถึง 45% (Ashikari *et al*., 2005)

นอกจากนี้พบว่ามียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนดอกย่อยต่อช่อดอก (spikelet number per panicle; *SPP1*) มี 4 QTLs ได้แก่ *SPP1*, *SPP2*, *SPP3* และ *SPP7* โดยยีน *SPP1* บนโครโมโซมที่ 1 เป็นตำแหน่ง QTLs หลัก มีตำแหน่งคล้ายกับที่เคยรายงานมาแล้ว คือ *sp1* และ *Gn1* (Xiong *et al*., 1999; Ashikari *et al*., 2005) ซึ่งจากรายงานของ Zhang และคณะ (2009) พบว่ายีน *SPP1* ไม่ใช่ยีน *Gn1a* ดังนั้นจึงมีการศึกษาตำแหน่งของยีน *SPP1* จนสามารถเข้าใกล้ และจำกัดขนาดของยีนได้ที่ขนาด 107 Kb ซึ่งอยู่ในบริเวณโคลน BAC (AP002094) ของฐานข้อมูลข้าว เมื่อทำนายยีนในบริเวณดังกล่าวพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะจำนวนดอกข้าวต่อรวง คือ LOC_Os01g12160 เป็นยีนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุม IAA synthetase ซึ่งเป็นออกซินในพืช ช่วยในการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเซลล์ จึงอาจเป็นไปได้ว่า LOC_Os01g12160 คือยีน *SPP1* (Liu *et al*., 2009)

ยีน *Ghd7* เป็น QTLs ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ความสูง และวันออกดอก จากรายงานการศึกษาตำแหน่งของยีนโดย Xue และคณะ (2008) เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลข้าวพบว่าอยู่บริเวณเซนโตเมียร์ของโครโมโซมแท่งที่ 7 มีขนาดประมาณ 2,284 กิโลเบส เมื่อทำนายยีนรวมถึงทำนายโปรตีนที่ได้จากยีนในบริเวณดังกล่าว พบว่ามียีนที่สามารถแปลรหัสได้โปรตีนที่คล้ายกับ CCT domain ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในผลผลิตของยีน *CO*, *CO*-LIKE (*COL*) และ TIMING of CAB1 (*TOC1*) มีบทบาทในการควบคุมการออกดอกในข้าว และจากการศึกษายีน *Ghd7* ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) โดยใช้ RNA จากต้นกล้าของข้าวพันธุ์ Minghui 63 ได้ขนาดของยีน 1,013 คู่เบส (cDNA) ทำนายว่าสามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 257 ตัว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลข้าวพบว่า มีลำดับเหมือน CCT domain ของ HD1 และโปรตีนที่ควบคุมกระบวนการในการออกดอก นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *Ghd7* มีการแสดงออกมากในสภาพวันยาว เมื่อศึกษาความสัมพันธ์กับยีนอื่นๆ ในกระบวนการ photoperiod pathway พบว่ายีน *Ghd7* อยู่ใน pathway เดียวกันกับยีน *Ehd1* และ *Hd3a* (Xue *et al*., 2008) ต่อมามีรายงานการศึกษายีน *SPP7* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการโคลนยีน *Ghd7* คือ มีตำแหน่งเดียวกัน และมีผลต่อลักษณะต่างๆ เหมือนกัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่ายีน *SPP7* อาจจะเป็นยีนเดียวกับ *Ghd7* (Zhang *et al*., 2009)

จากรายงานการศึกษา QTLs ของยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสามยีนทำให้ทราบตำแหน่งของยีน *Gn1a* คือตำแหน่งเบสที่ 5,269,103-5,274,678 บนโครโมโซมที่ 1 ยีน *SPP1* คือ LOC_Os01g12160 อยู่ตำแหน่งเบสที่ 6,623,963-6,629,463 บนโครโมโซมที่ 1 และยีน *Ghd7* คือตำแหน่งเบสที่ 9,151,408-9,175,046 บนโครโมโซมที่ 7 ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน (functional marker) หรือยึดติดกับยีน (target linked marker) ในฐานข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลของข้าวชนิด SSR marker (http://www.gramene.org/markers/microsat) เพื่อช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากด้วยวิธีผสมกลับ เนื่องจากลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตข้าวนั้นเป็นลักษณะเชิงปริมาณ ดังนั้นการคัดเลือกจากฟีโนไทป์จึงทำได้ยากเพราะอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะดังกล่าว การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนหนึ่งของยีนหรือยึดติดกับยีนที่ต้องการถ่ายทอดจากพันธุ์ให้สู่พันธุ์รับ (foreground selection) (Hospital and Charcosset, 1997) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ และความแม่นยำในการคัดเลือก รวมถึงลดระยะเวลาในการผสมกลับจากปกติต้องผสมกลับถึง 6 ครั้ง เหลือเพียง 4 ครั้ง (Frisch *et al*., 1999)

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกกันมาก เนื่องจากลักษณะข้าวสุกนุ่มเหนียว และมีกลิ่นหอม เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ในแต่ละปีประเทศไทยปลูกข้าวเหนียวเฉลี่ย 18 ล้านไร่ หรือร้อยละ 31 ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด ในจำนวนนี้เป็นพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 สูงถึง 15 ล้านไร่ หรือ ร้อยละ 83 ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียว (กรมวิชาการเกษตร, 2546) ในอดีตนิยมปลูกข้าวเหนียวเพื่อบริโภคภายในครัวเรือนโดยเฉพาะภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ที่เหลือจึงจำหน่ายทั้งภายใน และต่างประเทศ สามารถส่งออกทั้งในรูปเมล็ดข้าวสารและผลิตภัณฑ์ประมาณ 2 แสนตัน คิดเป็นมูลค่า 3 พันล้านบาท ของการส่งออกในแต่ละปี (สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว, 2550) และมีแนวโน้มความต้องการของตลาดโลกสูงขึ้น ซึ่งการเพิ่มผลผลิตของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ทำได้โดยการปรับปรุงพันธุ์ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากขึ้นด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker assisted backcrossing; MAB) ทำให้ได้ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่มีคุณภาพดีเหมือนเดิม แต่มีผลผลิตเพิ่มขึ้น

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตข้าวทั้งสามยีน ได้แก่ ยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* และเป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง เพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวระหว่างการผสมกลับแต่ละครั้งในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

1.1 การคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ ทำการรวบรวม และคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากเพื่อใช้เป็นพันธุ์ให้ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก โดยใช้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองของภาคต่างๆ จากกรมการข้าว และมูลนิธิฮักเมืองน่าน และพันธุ์แนะนำต่างๆ รวมทั้งหมด 43 พันธุ์ ได้แก่ Taichung 65, กข 10, สันป่าตอง 1, กข 6, ดอกพะยอม, เข็มทอง, นางพญา 132, กข 13, กันตัง, ทรายทอง, ช่อลุง, เหลืองหอม, เมืองไทร, งวงช้าง, แปดริ้ว, เม็ดมะเขือ, ข้าวเหลืองพันธุ์งาม, ข้าวหมากแขก, ข้าวอิฐขาว, ข้าวชาบีต้า, ข้าวเหนียว, ข้าวนางหก, ข้าวพ่อมุข, ข้าวแก้วดอ, ข้าวดวงจันทร์, ข้าวหล่ม, ข้าวแตงอ่อน, ข้าวกรุง, ข้าวเหนียวแดง, ข้าวทองมะโร, ข้าวเล้าแตก, ข้าวแม่ผึ้ง, ข้าวก่ำ, แบ้ร์เด้อ, หวัน 1, หวัน 2, จาแอ๊, จากอลอย จาเฟ้ย, ข้าวเหลือง (ด้ะ), บือโพปริ, บือกะ, นาแต้ และพันธุ์จานอสี โดยปลูกข้าวแต่ละพันธุ์ในฤดูนาปี พ.ศ. 2551 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างรวงข้าว 1 รวงต่อกอ เก็บจำนวน 10 กอ แล้วนับจำนวนเมล็ดทั้งหมดต่อรวง จำนวนเมล็ดดีต่อรวง และจำนวนเมล็ดลีบต่อรวง จากนั้นหาค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวแต่ละพันธุ์ นอกจากนี้ทำการเก็บข้อมูลของลักษณะความสูง อายุออกดอก จำนวนต้นต่อกอ และจำนวนรวงต่อกอ การคัดเลือกพันธุ์ให้พิจารณาจากข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยคัดเลือกข้าวพันธุ์ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุดเพื่อเป็นพันธุ์ให้ ประกอบกับข้อมูลของลักษณะอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น ความสูง อายุออกดอก ให้มีค่าใกล้เคียงกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 สำหรับใช้เป็นพันธุ์ให้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก คัดเลือกได้ข้าวพันธุ์แปดริ้ว (แสดงผลใน Table 1)

1.2 ข้าวพันธุ์รับ คือ ข้าวพันธุ์ กข 6 (RD 6) เป็นข้าวเหนียวไวต่อช่วงแสง ผลผลิตเฉลี่ย ประมาณ 666 กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว, 2550)

2. การผสมพันธุ์สร้างลูกผสมชั่วที่ 1

ฤดูที่ 1 นาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) ปี พ.ศ. 2551 ผสมข้าวพันธุ์ กข 6 กับพันธุ์แปดริ้ว เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

3. การผลิตเมล็ดชั่วที่ 2 และปลูกลูกผสมชั่วที่ 2

ฤดูที่ 2 นาปรัง (มกราคม – มิถุนายน) ปี พ.ศ. 2552 ผลิตเมล็ดชั่วที่ 2 (F_2) ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับพันธุ์แปดริ้ว โดยปลูกเมล็ด F_1 จากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2

ฤดูที่ 3 นาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) ปี พ.ศ. 2552 ปลูก F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับพันธุ์แปดริ้ว เพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

4. การหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* (target linked marker)

4.1 ทำการค้นหาตำแหน่งของยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ในฐานข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลของข้าวชนิด SSR marker แล้วคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSR marker ที่อยู่ใกล้กับลำดับเบสของแต่ละยีน (Ashikari *et al*., 2005; Liu *et al*., 2009 และ Zhang *et al*., 2009) ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับยีน (target linked marker) โดยคัดเลือกเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนมากที่สุด และมีระยะจากทั้งสองข้างของยีนไม่เกิน 95,000 เบส แล้วสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 และพันธุ์แปดริ้ว (Table 2)

4.2 ตรวจสอบเครื่องหมาย SSR marker ที่คัดเลือกไว้ว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 และ แปดริ้ว หรือไม่ โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวของพันธุ์ กข 6 และแปดริ้ว ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Genomic DNA Purification Kit Cat #K0512, Fermentas Inc.) ตามขั้นตอนการสกัดของบริษัท จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1.5 µl สารละลาย 1x Go Taq® Green Master Mix (400 µM dNTPs reaction buffer (pH 9) 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mM $MgCl_2$ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.1 units/µl) (Cat no. M7123, Promega Corporation) ปริมาตร 7.5 µl สารละลาย forward และ reverse primer ที่ความเข้มข้น 3 µM ปริมาตร 2 µl และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ปริมาตร 2 µl ปริมาตรรวมทั้งหมด 15 µl เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ในขั้นตอน predenaturing ในแต่ละรอบ ขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที และทำปฏิกิริยาซ้ำอีกจำนวน 35 รอบ รอบ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วตรวจสอบผลที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้วุ้นอะกาโรส (GenePure Hi res Agarose, Cat no. E-3115-25, ISCBIOE-epress) เข้มข้น 4% ในสารละลาย 1x TBE buffer จากนั้นย้อมสีชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แถบดีเอ็นเอเรืองแสงภายใต้แสงยูวี บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง GelDoc (Bio-Rad Laboratories Ltd.)

4.3 คัดเลือกเครื่องหมาย SSR marker ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* โดยเลือกเครื่องหมาย SSR marker ที่แสดงแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ กข 6 กับพันธุ์แปดริ้ว ของแต่ละยีน พิจารณาภาพแถบดีเอ็นเอประกอบการเลือกเครื่องหมาย SSR marker ที่ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์มีค่าต่างกันมาก และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด เพื่อใช้คัดเลือกต้น F_1 และตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 ต่อไป

5. การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่าง กข 6 กับแปดริ้ว

5.1 เก็บตัวอย่างรวงข้าวของประชากร F_2 โดยเก็บรวงข้าวที่อยู่บนตำแหน่งสูงสุดของแต่ละกอ จำนวน 5 รวง เก็บตัวอย่าง F_2 ทั้งหมด 100 กอ ซึ่งแต่ละกอต้องมีต้นข้าวกออื่นขนาบข้างครบทั้งสี่ด้าน นับจำนวนเมล็ดทั้งหมดจากนั้นหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงของ F_2 แต่ละต้น เพื่อเป็นข้อมูลฟีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์กับเครื่องหมาย SSR marker ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ซึ่งใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ (genotypee)

5.2 เก็บใบข้าวของต้น F_2 ทั้ง 100 กอ มาสกัดดีเอ็นเอ ดังวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 แต่ละต้น ในการทำพีซีอาร์ใช้เครื่องหมาย SSR marker ของแต่ละยีนที่ได้คัดเลือกไว้ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ กข 6 กับพันธุ์แปดริ้ว แล้วตรวจสอบผลที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยประชากร F_2 นี้ มีการกระจายตัวของยีน โดยกำหนดให้ตัวอย่างต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือน กข 6 มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 แถบดีเอ็นเอเหมือนแปดริ้ว มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 และต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของ กข 6 และแปดริ้ว มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 เพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงที่เป็นข้อมูลฟีโนไทป์

5.3 วิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แต่ละเครื่องหมายกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ด้วยวิธี single regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่ยึดติดกับยีนแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือไม่ จากนั้นจึงวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) ด้วยวิธี multiple regression เพื่อศึกษาว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่ยึดติดกับยีนแต่ละยีนทั้งหมดที่คัดเลือกได้นั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด โดยใช้โปรแกรม SAS ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้

จากการรวบรวม และคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ ในฤดูนาปี พ.ศ. 2551 ซึ่งได้ศึกษาข้าวพันธุ์พื้นเมือง และข้าวพันธุ์ต่างๆ ทั้งหมด 43 พันธุ์ พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อรวงเรียงลำดับจากมากที่สุดไปหาน้อยที่สุดลำดับที่ 1 ถึง 5 ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Showing the plant height, flowering date and total grain number per panicle of 6 rice cultivars in the rainy season 2008.

No.	Variety name	Plant height (cm)	Flowering date (days)	Grain number per panicle (seeds)
1	Mueang Sai	166	145	338
2	Paet Rio	212	128	266
3	Med Makhuea	181	138	264
4	Khao Kaeo Do	210	107	262
5	Cho Lung	222	147	261
6	RD 6	195	113	207

จากข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวทั้ง 43 พันธุ์ พบว่าพันธุ์ข้าวที่มีศักยภาพสามารถใช้เป็นพันธุ์ให้ ได้แก่ พันธุ์เมืองไทร, แปดริ้ว และเม็ดมะเขือ ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ยสูงถึง 338, 266 และ 264 เมล็ด ตามลำดับ และข้าวพันธุ์รับ กข 6 มีเมล็ดต่อรวงเฉลี่ยเท่ากับ 207 เมล็ด เมล็ดลีบเฉลี่ยเท่ากับ 12 เมล็ด เมล็ดดีเฉลี่ยเท่ากับ 195 เมล็ด อายุออกดอก 113 วัน ความสูงต้นเฉลี่ยเท่ากับ 195 เซนติเมตร เมื่อพิจารณาอายุออกดอกของข้าวทั้งสามพันธุ์กับข้าวพันธุ์รับ กข 6 พบว่า ข้าวพันธุ์แปดริ้วมีอายุออกดอก 128 วัน ใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ กข 6 ที่มีอายุออกดอกเท่ากับ 113 วัน ขณะที่ข้าวพันธุ์เม็ดมะเขือ กับเมืองไทรมีอายุออกดอก 138 และ 145 วัน ซึ่งห่างจากอายุออกดอกของข้าวพันธุ์ กข 6 ถึง 25 และ 32 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความสูง พบว่าข้าวพันธุ์แปดริ้ว, เม็ดมะเขือ และข้าวพันธุ์ กข 6 มีความสูงใกล้เคียงกัน คือ 212, 181 และ 195 เซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่ข้าวพันธุ์เมืองไทรมีความสูงเฉลี่ย 166 เซนติเมตร ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการกระจายตัวของลักษณะความสูง และอายุออกดอกในประชากร F_2 จึงคัดเลือกข้าวพันธุ์แปดริ้วซึ่งมีลักษณะความสูง และอายุออกดอกใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ กข 6 และมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่าข้าวพันธุ์เม็ดมะเขือเป็นพันธุ์ให้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก

2. การหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* (target linked marker)

จากการค้นหาตำแหน่งของยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ในตาราง supplementary table 18 (http://www.gramene. org/markers/microsat) แล้วทำการคัดเลือกเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้กับลำดับเบสของยีนแต่ละยีนมากที่สุด ได้เครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Gn1a* ทั้งหมด 10 เครื่องหมาย ได้แก่ RM10310, RM10311, RM10312, RM10313, RM10314, RM10315, RM10316, RM10318, RM10319 และ RM10326 คัดเลือกได้เครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *SPP1* ทั้งหมด 10 เครื่องหมาย ได้แก่ RM10390, RM10393, RM10394, RM10395, RM10396, RM10397, RM10398, RM10400, RM10401 และ RM10402 และคัดเลือกได้เครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Ghd7* ทั้งหมด 10 เครื่องหมาย ได้แก่ RM3859, RM21332, RM21333, RM21334, RM5436, RM21335, RM21336, RM21339, RM21340 และ RM21342 ซึ่งเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนแต่ละยีน บางเครื่องหมาย ดังแสดงใน Table 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2 Showing gene, RM locus ID, chromosome, SSR start, SSR end, distance between markers and target gene also forward and reverse primer sequences of SSR markers that linked to *Gn1a*, *SPP1* and *Ghd7* (supplementary table 18).

Order	RM Locus ID	Chr.	SSR Start (base)	SSR End (base)	Distance (base)	Forward Primer Sequences	Reverse Primer Sequences
Gn1a							
1	RM10314	1	5,241,778	5,241,797	25,108	CATGCATACTTTGTGCCTTGTCC	GCACGTGCTCCTACATTGATGC
2	RM10315	1	5,243,215	5,243,274	23,631	CAAGTTGCACACACCAAGATGC	CCCTCCTGATCATATCCCTTGC
	Gn1a		**5,266,905**	**5,272,480**			
3	RM10316	1	5,286,497	5,286,516	14,017	AAGATCGCTGGGAGATCTGTAGG	GCATGCTAATTAGTCAGCCTTGG
4	RM10318	1	5,359,033	5,359,052	86,553	TGTCTCACACATTGCACACTTACC	GGCCTAACCCAACACATGTCC
SPP1							
1	RM10393	1	6,600,019	6,600,054	23,909	GGCAGAGAAGATCGAATATGATGG	TAGCTACGCGCGTTCTTCATAGC
2	RM10394	1	6,629,276	6,629,295	-5,332	CAGCAGCAGCGAGATTAACAGC	GTCGTCTCTTGCTCTGTTCTTGG
	SPP1		**6,623,963**	**6,629,463**			
3	RM10395	1	6,639,665	6,639,712	10,202	GCAAGATTCAGTTCAGGTTTGC	ATGTGCCCTTTCGTTGTACTCC
4	RM10396	1	6,639,789	6,639,840	10,326	TTTGCAGGTGGACAGGAAATGG	AATAGCAGCTTGCTTGGATGTGC
Ghd7							
1	RM21335	7	9,107,916	9,107,949	76,610	TGAGCTGCACAAGACAGACAAGC	ACCATTTGAACAGGATGGACTGG
2	RM21336	7	9,184,332	9,184,379	180	GTGCTTGCATATAACCTATA	AGATCAACCTTCTTATTCAG
	Ghd7		**9,184,559**	**9,187,187**			
3	RM21339	7	9,187,154	9,187,174	33	CAGCTAGCTAGGGTTGTGAAATGC	GACCAAATCCATCCACAGATCG
4	RM21340	7	9,275,340	9,275,359	88,153	GGGAGAGCGAGAGCAAGAGAACG	TTGTTGTCAGTCTCCATGCCAATCC

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

เมื่อนำเครื่องหมาย SSR marker ที่คัดเลือกได้มาตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์รับ (กข 6) กับพันธุ์ให้ (แปดริ้ว) โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 และ แปดริ้ว เป็นแม่พิมพ์ในการทำพีซีอาร์ พบว่ามีเครื่องหมาย SSR marker ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้วได้แก่ RM10318 ซึ่งอยู่ใกล้กับยีน *Gn1a* ที่ระยะ 86,553 เบส เครื่องหมาย RM10395 อยู่ใกล้กับยีน *SPP1* ที่ระยะ 10,202 เบส และ RM21335 อยู่ใกล้กับยีน *Ghd7* ที่ระยะ 76,610 เบส (Table 3) ดังนั้นจึงใช้เครื่องหมายดังกล่าวในการคัดเลือกต้น F_1 และตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรเมอร์ RM10395 สำหรับศึกษายีน *SPP1* ดังแสดงใน Figure 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3 Showing RM locus ID, gene, chromosome, SSR start, SSR end, forward and reverse primer sequences of SSR markers that linked to *Gn1a*, *SPP1* and *Ghd7* (supplementary table 18).

Order	RM Locus ID	Gene	Chr.	SSR Start (base)	SSR End (base)	Distance (base)	Forward Primer Sequences	Reverse Primer Sequences
1	RM10318	Gn1a	1	5,359,033	5,359,052	86,553	TGTCTCACACATTGCACACTTACC	GGCCTAACCCAACACATGTCC
2	RM10395	SPP1	1	6,639,665	6,639,712	10,202	GCAAGATTCAGTTCAGGTTTGC	ATGTGCCCTTTCGTTGTACTCC
3	RM21335	Ghd7	7	8,910,448	8,910,503	76,610	TGAGCTGCACAAGACAGACAAGC	ACCATTTGAACAGGATGGACTGG

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

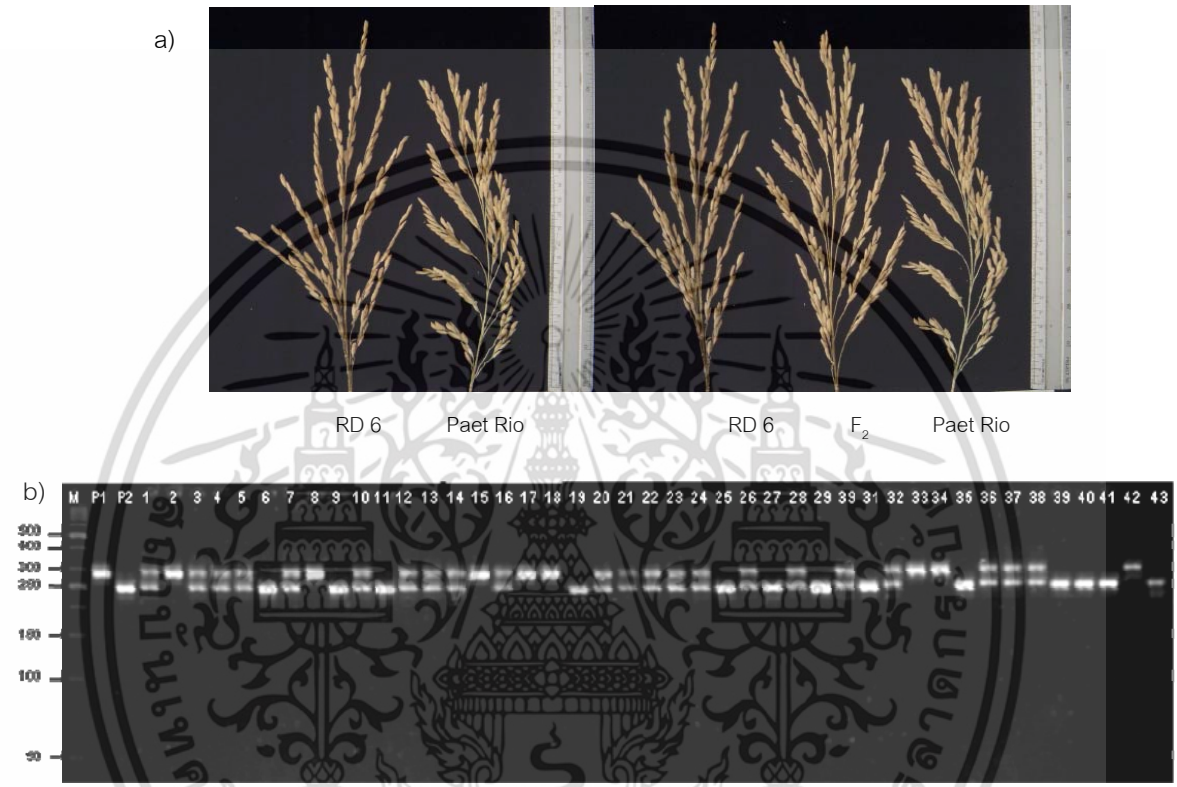

Figure 1 a) Grain number per panicle of recurrent parent (RD 6) and donor parent (Paet Rio) and their F_2 progeny in the rainy season 2009. b) profiles of SSR marker on 4% agarose gel from RM10395 in F_2 progeny that linked to gene SPP1. M is represent 50 bp ladder, P1 = RD 6, P2 = Paet Rio, lane 1-43 are F_2 of crossing between RD 6 and Paet Rio.

3. **การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับยีน** Gn1a, SPP1 **และ** Ghd7 **ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงของประชากร** F_2 **ของคู่ผสมระหว่าง กข 6 กับแปดริ้ว**

จากการเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ในประชากร F_2 จำนวน 100 ต้น โดยนับจำนวนเมล็ดแล้วหาค่าเฉลี่ยเป็นจำนวนเมล็ดต่อรวงของแต่ละต้น ได้ค่าเฉลี่ย 214 เมล็ดต่อรวง ขณะที่ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข 6 และพันธุ์แปดริ้ว ได้เท่ากับ 176 และ 244 เมล็ดต่อรวง ตามลำดับ ซึ่งผลต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงระหว่างประชากร F_2 กับพันธุ์รับ กข 6 คือ มีจำนวนเมล็ดมากกว่า กข 6 จำนวน 38 เมล็ด แต่มีเมล็ดน้อยกว่าพันธุ์ให้แปดริ้ว จำนวน 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ด ตามลำดับ (Table 4) เมื่อนำข้อมูลฟีโนไทป์ของตัวอย่างในประชากร F_2 จำนวน 100 ต้น มาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยโปรแกรม SAS พบว่า ประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่าง กข 6 กับ แปดริ้วนั้นมีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) ดังแสดงใน Figure 2 ค่า skewness ซึ่งอธิบายความเบ้ของกราฟเท่ากับ 0.068 แสดงว่าลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงนี้เป็นลักษณะเชิงปริมาณ มียีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวมากกว่า 1 ยีน และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน

Table 4 Range and mean of grain number per panicle in F_2 progeny and their parents (RD 6 X Paet Rio).

Population	Range	Mean ± SD	Distance
RD 6 (recurrent parent)	126-229	175.83±29.63	38
F_2 progeny	145-282	214.10±33.99	
Paet Rio (donor parent)	181-318	243.83±33.20	30

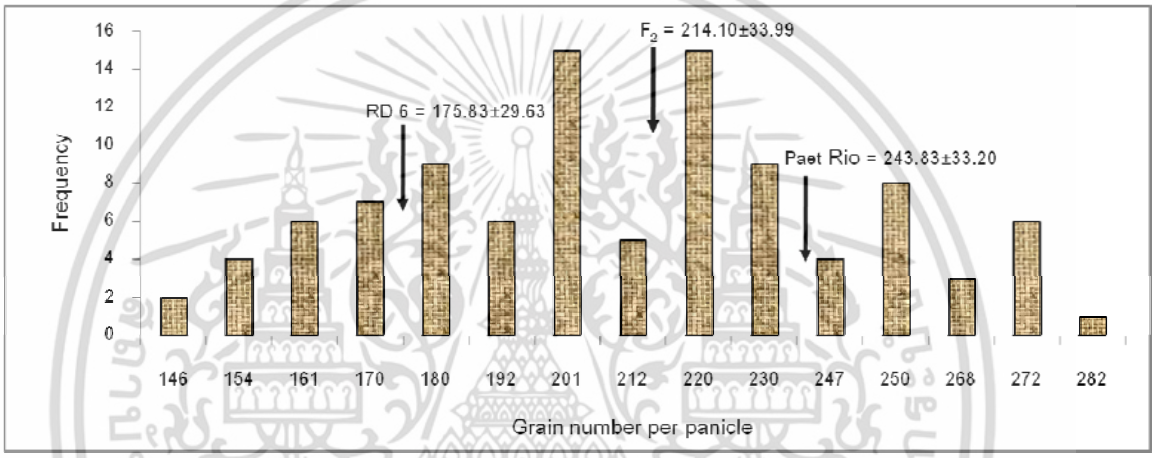

Figure 2 Frequency distribution of grain number per panicle trait showing normal frequency distribution in the F_2 progeny derived from cross between RD 6 and Paet Rio in the rainy season 2009. Arrows are indicated mean value.

เมื่อวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RM10318, RM10395 และ RM21335 ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แต่ละเครื่องหมาย โดยใช้คะแนนจีโนไทป์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับ แปดริ้ว จำนวน 100 ต้น ด้วยวิธี single regression พบว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่ยึดติดกับยีนแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยเครื่องหมาย RM10395 ที่ยึดติดกับยีน *SPP1* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับจำนวนเมล็ดต่อรวง มีค่า R-square เท่ากับ 0.0953 ในขณะที่เครื่องหมาย RM10318 และ RM21335 ซึ่งยึดติดกับยีน *Gn1a* และ *Ghd7* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับจำนวนวนเมล็ดต่อรวง ค่า R-square เท่ากับ 0.0829 และ 0.0830 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ดังแสดงใน Table 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 5 Single regression analysis of each SSR marker with it's linkage gene related to grain number per panicle of F_2 progeny derived from RD 6 x Paet Rio in the rainy season 2009

Gene	SSR Marker	R-Square	F Value	P-value
Gn1a	RM10318	0.082920	4.39	0.0150*
SPP1	RM10395	0.095364	5.11	0.0077**
Ghd7	RM21335	0.083019	4.39	0.0149*

* Significant ** Highly significant

จากนั้นจึงวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมาย RM10318, RM10395 และ RM21335 ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ทั้งหมดที่คัดเลือกได้ กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี multiple regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ทั้งหมดนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด พบว่าเครื่องหมาย RM10395 ซึ่งยึดติดกับยีน *SPP1* มีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P=0.0018) และมีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0949

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้จากพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก ในฤดูนาปี พ.ศ. 2551 จำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ยของข้าวพันธุ์ กข 6 และแปดริ้ว เท่ากับ 207 และ 266 เมล็ด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูนาปี พ.ศ. 2552 ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 176 และ 244 เมล็ด ตามลำดับ พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข 6 กับแปดริ้วลดลงถึง 15% และ 8% ตามลำดับ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าในฤดูนาปี พ.ศ. 2552 นี้ ข้าวพันธุ์ กข 6, แปดริ้ว และประชากร F_2 ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม โดยลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงนั้นเป็นลักษณะเชิงปริมาณ ดังนั้นสิ่งแวดล้อมภายนอก อาทิเช่น การให้ปุ๋ย ปัญหาเรื่องโรคแมลงที่รบกวนในแปลงนาจึงมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน นอกจากนี้การล้มของต้นข้าวเนื่องจากเป็นข้าวพันธุ์ต้นสูงจึงส่งผลให้ผลผลิตหรือจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูนาปี พ.ศ. 2552 ลดลงจากในฤดูนาปี พ.ศ. 2551 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yan และคณะ (2009) ที่กล่าวถึงอิทธิพลของสภาพแวดล้อมต่อการแสดงออกของยีน *Gn1a* กล่าวคือ ข้าวพันธุ์ Habataki ที่ปลูกในประเทศญี่ปุ่นจากรายงานของ Ashikari และคณะ (2005) ได้จำนวนเมล็ดต่อรวงเท่ากับ 306 เมล็ด ขณะที่ปลูกที่ Yangzhou ประเทศจีน ได้จำนวนเมล็ดต่อรวง 200 เมล็ด ซึ่งจำนวนเมล็ดลดลงประมาณ 35% ในการทดลองนี้เมื่อวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR marker RM10318, RM10395 และ RM21335 ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แต่ละเครื่องหมาย กับจำนวนเมล็ดต่อรวง พบว่าแต่ละเครื่องหมายที่ยึดติดหรืออยู่ใกล้กับยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง สอดคล้องกับรายงานการศึกษายีน *Gn1a* ที่ทำให้จำนวนเมล็ดข้าวต่อรวงบนลำต้นหลัก (main panicle) เพิ่มขึ้น 21% ในข้าวสายพันธุ์คู่แฝดของข้าวพันธุ์ Koshihikari (NIL-*Gn1a*/*Gn1a*) (Ashikari *et al*., 2005) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษายีน *SPP1* ซึ่งเป็น QTLs หลักของจำนวนดอกย่อยต่อช่อดอก โดยใช้ประชากร F_2 และ F_3 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์รับ Zhenshan 97 (91 ดอกย่อยต่อช่อดอก) กับพันธุ์ให้ Teqing (226 ดอกย่อยต่อช่อดอก) พบว่ายีน *SPP1* มี dominant effects ต่อจำนวนดอกย่อยต่อช่อดอกสูงถึง 51.1% และมีผลต่อจำนวนเมล็ดต่อรวง 24.5% (Liu *et al*., 2009) รวมถึงรายงานการศึกษายีน *Ghd7* ซึ่งเป็น QTLs ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง ความสูง และวันออกดอก โดยใช้ประชากร BC_2F_2ของคู่ผสมระหว่าง Zhenshan 97 กับ Minghui 63 พบว่าอัลลีลของยีน *Ghd7* ที่ได้จากข้าวพันธุ์ Minghui 63 สามารถเพิ่มจำนวนดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยต่อช่อดอกบนลำต้นหลักได้ 65.8% และให้ผลผลิตข้าวต่อต้นเพิ่มขึ้น 50.9% นอกจากนี้ยังส่งผลให้ต้นข้าวสูงขึ้น 40% และมีวันออกดอกช้าคิดเป็น 33% (Zhang *et al*., 2009)

สรุป

ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข 6 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ยเท่ากับ 207 เมล็ด ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเพิ่มมากขึ้น จึงคัดเลือกข้าวพันธุ์แปดริ้วที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ยเท่ากับ 266 เมล็ด เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) นอกจากนี้พันธุ์แปดริ้วยังมีความสูงใกล้เคียงกัน คือ 195 และ 212 เซนติเมตร มีอายุออกดอกใกล้เคียงกันที่ 113 และ 128 วันตามลำดับ เพื่อหลีกเลี่ยงการกระจายตัวของลักษณะดังกล่าวในประชากร F_2 สำหรับการหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR marker ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงในข้าว ได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนดังกล่าวมาตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว พบว่าเครื่องหมาย RM10318, RM10395 และ RM21335 ที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ การศึกษาหาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับยีนแต่ละยีนที่หาได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี single regression พบว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่หาได้ทั้งสามเครื่องหมายนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยเครื่องหมาย RM10395 ที่ยึดติดกับยีน *SPP1* มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) มีค่า R-square เท่ากับ 0.0953 ในขณะที่เครื่องหมาย RM10318 และ RM21335 ซึ่งยึดติดกับยีน *Gn1a* และ *Ghd7* นั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ค่า R-square เท่ากับ 0.0829 และ 0.0830 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่หาได้ทั้งหมดนี้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี multiple regression พบว่าเครื่องหมาย RM10395 ซึ่งอยู่ใกล้กับยีน *SPP1* เท่ากับ 10,202 เบส มีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0949 และมีค่าระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.0018 เป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุล RM10395 สามารถใช้ช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงข้าวเหนียว พันธุ์ กข 6 ให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากได้ด้วยวิธีผสมกลับ โดยใช้ข้าวพันธุ์แปดริ้วซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากเป็นพันธุ์ให้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมการข้าว และคุณสำรวย ผัดผล ผู้นำกลุ่มมูลนิธิฮักเมืองน่าน ที่เอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวเพื่อการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2543. พันธุ์พืชขึ้นทะเบียนและพันธุ์พืชรับรอง ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ฝ่ายพันธุ์พืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 293 น.

กรมวิชาการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/45 เอกสารวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี.

สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว. 2550. ข้าวเหนียว: อนาคต การผลิต และการค้า. กรุงเทพฯ: สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว กรมการข้าว. 31 น.

Ashikari, M., H. Sakakibara, S. Lin and M. Matsuoka. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. Science. 309. 741-745.

Frisch, M., M. Bohn and A. E. Melchinger. 1999. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. Crop Sci. 39: 967-975.

Hospital, F. and A. Charcosset. 1997. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. Genetics 147. 1469-1485.

Liu, T., D. Mao and Y. Xing. 2009. Fine mapping *SPP1*, a QTL controlling the number of spikelets per panicle, to a BAC clone in rice (*Oryza sativa*). Theor. Appl. Genet. 118: 1509–1517.

Mok, D. W. S. and M. C. Mok. 1994. Cytokinins: chemistry, activity and function. United States: CRC Press. 338 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xiong, L.Z., K.D. Liu, X. Dai, C.G. Xu and Q.F. Zhang. 1999. Identification of genetic factors controlling domestication-related traits of rice using an F_2 population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon*. Theor. Appl. Genet. 98: 243–251.

Xue, W., Y. Xing and Q. Zhang. 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. Nat Genet. 40(6). 761–76.

Yoshida, S. 1981. Fundamentals of rice crop science. Laguna: International Rice Research Institute. 269 pp.

Zhang, Y., L. Luo, T. Liu, C. Xu and Y. Xing. 2009. Four rice QTL controlling number of spikelets per panicle expressed the characteristics of single Mendelian gene in near isogenic backgrounds. Theor. Appl. Genet. 118: 1035–1044.

Yan, C.J., S. Yan, Y.C. Yang and M.H. Gu. 2009. Development of gene-tagged markers for Quantitative trait loci underlying rice yield components. Euphytica 169: 215-226.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้