



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 1 ลักษณะคุณภาพของตัวอย่างข้าวป่าที่เก็บจากสภาพธรรมชาติ (*O. rufipogon*) ข้าววัชพืชที่มีลักษณะข้าวป่า (Weedy rice) ข้าวแดง (Red rice) และข้าวพันธุรูปตฤศพรณบุรี

1 (SPR1)

จำนวน ตัวอย่าง	ลักษณะ ทรงกอ	สีแผ่น ใบ	สีภายใน ใบ	สีข้าวใบ สีในใบ	รูปร่างดิน ใบ	สีข้อ ปล้อง	ข้อใบ	การไหลของ เมล็ด	สีของดอก	สีหาง	หางข้าว	สียอดหุ้ม หุ้มเมล็ด	เมล็ด
<i>O. rufipogon</i>													
5503-1	เอน	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	ยาวทุกเมล็ด	ดำ	แดง
5503-2	เอน	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	ยาวทุกเมล็ด	ดำ	แดง
5503-3	เอน	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	ยาวทุกเมล็ด	ดำ	แดง
5503-4	เอน	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	ยาวทุกเมล็ด	ดำ	แดง
LP	แผ่	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี-แดง	ขาว-แดง	ยาวทุกเมล็ด	ดำ	แดง
CM	แผ่	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี-แดง	ขาว-แดง	ยาวทุกเมล็ด	ดำ	แดง
Weedy rice													
WS#1-1	ตั้ง	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	ยาวทุกเมล็ด	ดำ	ขาว
WS#1-2	ตั้ง	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	ยาวทุกเมล็ด	ดำ	ขาว
WS#2-1	ตั้ง	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	บางเมล็ด > 1 cm	ฟางเข้ม	ขาว
WS#2-2	ตั้ง	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	บางเมล็ด > 1 cm	ฟางเข้ม	ขาว
WS#2-3	ตั้ง	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	บางเมล็ด > 1 cm	ฟางเข้ม	ขาว
WS#2-4	ตั้ง	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	บางเมล็ด > 1 cm	ฟางเข้ม	ขาว
WS#2-5	ตั้ง	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	เขียว	เขียว	ไม่มีสี	ขาว	บางเมล็ด > 1 cm	ฟางเข้ม	ขาว

ภาคผนวก 2 การประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่เป็นลักษณะทางคุณภาพ (IRRI-
IBPRG, 1980)

ลักษณะ	เกณฑ์การประเมิน
1. สีแผ่นใบ	(1) เขียวอ่อน (2) เขียว (3) เขียวเข้ม (4) ม่วงที่ปลาย (5) ม่วงที่ริมขอบ (6) ม่วงผสมเขียว (7) ม่วงทั้งใบ
2. สีกาบใบ	(1) เขียว (2) เขียวเส้นม่วง (3) ม่วงอ่อน (4) ม่วง
3. สีลิ้นใบ	(1) ขาว (2) ขาวเส้นม่วง (3) ม่วง
4. รูปร่างลิ้นใบ	(1) แหลม (2) มี 2 ยอด (3) ไม่มีแหลม
5. สีหูใบ	(1) เขียว (2) เขียวเส้นม่วง (3) ม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. สี่ซ้อ

- (1) เจียวอ่อน
- (2) เจียว
- (3) ม่วง

7. สี่ซ้อต่อใบ

- (1) เจียวอ่อน
- (2) เจียว
- (3) ม่วง

8. สี่ปล้อง

- (1) เจียว
- (2) เหลืองอ่อน
- (3) เจียวเส้นม่วง
- (4) ม่วง

9. สี่ยอดเกสรตัวเมีย

- (1) ขาว
- (2) เจียวอ่อน
- (3) เหลือง
- (4) ม่วงอ่อน
- (5) ม่วงดำ

10. สี่ยอดดอก

- (1) ขาว
- (2) ฟาง
- (3) น้ำตาล
- (4) แดง
- (5) ชมพู
- (6) ม่วง
- (7) ม่วงดำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

11. สีกลิบรองดอก

- (1) ฟาง
- (2) เหลือง
- (3) แดง
- (4) ม่วงดำ
- (5) น้ำตาล

12. หางข้าว

- (0) ไม่มี
- (1) สั้นและมีบางเมล็ด
- (5) สั้นและมีทุกเมล็ด
- (7) ยาวและมีบางเมล็ด
- (9) ยาวและมีทุกเมล็ด

13. สีของหางข้าว

- (1) ฟาง
- (2) เหลือง
- (3) น้ำตาล
- (4) แดง
- (5) ม่วง
- (6) ดำ

14. ทรงกอ

- (1) ตั้งตรง
- (3) เอนเล็กน้อย
- (5) เอน
- (7) เอนมาก
- (9) นอน

15. สีเปลือก

- (1) ฟาง
- (2) ฟางสลับน้ำตาล
- (3) น้ำตาลเข้มขีดเหลือง
- (4) ฟางกระน้ำตาล
- (5) ม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

16. สีเยื่อหุ้มเมล็ด

- (1) ขาว
- (2) แดง
- (3) น้ำตาล
- (4) น้ำตาลเข้ม

ภาคผนวก 3 การเตรียมตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างใบแห้งที่เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -20°C บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB ตามขั้นตอนดังนี้

ภาคผนวก 4 การสกัดดีเอ็นเอ

ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) โดย extraction buffer ประกอบด้วย double deionized water, 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl และ 0.4% β -mercaptoethanol แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (ปฏิกิริยา PCR)

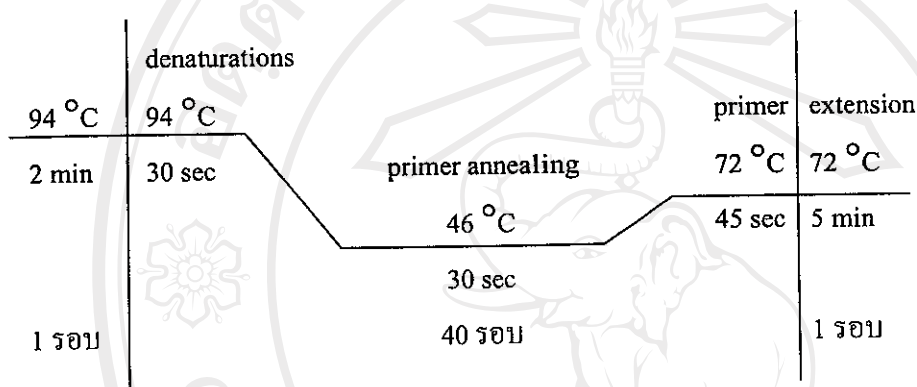
ภาคผนวก 5 การใช้เทคนิค RAPD

นำเอาดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มขยายปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยเทคนิค HAT-RAPD ซึ่งดัดแปลงจาก Anuntalabhochai *et al.* (2000) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ของ University of British Columbia (UBC) อย่างสุ่ม ได้แก่ 101, 119, 173 และ 241 (ชื่อและลำดับเบสในภาคผนวก 9) โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าวจำนวน 22 ประชากร เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA Template)

ใส่สารผสมปริมาตร 20 μL ประกอบด้วย double deionized water 15.0 μL , 10X buffer 2.0 μL , 50 mM MgCl_2 1.0 μL , 25 mM dNTP 0.16 μL , primer 100 ng/ μL 0.8 μL , 5 unit *Taq* DNA polymerase 0.125 μL , DNA template 1 μL ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 0.2 mL ที่จะนำเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดเงื่อนไข คือ 94°C นาน 2 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94°C นาน 30 วินาที 46°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 72°C นาน 5 นาที 1 รอบ (ภาคผนวก 6)

นำ PCR product ไปตรวจสอบใน 2.0% agarose gel electrophoresis นำเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide 5 μL /TBE buffer 100 mL เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาลอยด์เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

ภาคผนวก 6 เงื่อนไขการทำ PCR (HAT-RAPD)

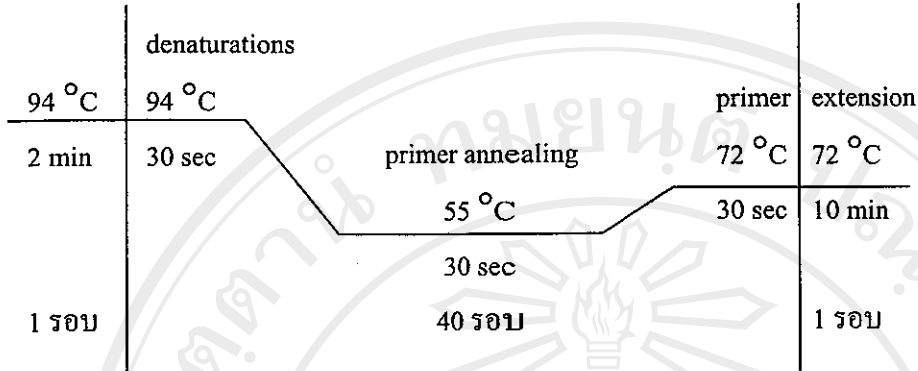


ภาคผนวก 7 การใช้เทคนิค Microsatellite

นำเอาดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มขยายปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าวจำนวน 22 ประชากร เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA Template) ไพร์เมอร์ (primer) ได้แก่ RM 1 และ RM 241 ปฏิกิริยานี้ใส่สารผสมปริมาตร 20 μL ประกอบด้วย double deionized water 15.0 μL , 10X buffer 2.0 μL , 50 mM MgCl_2 1.0 μL , 25 mM dNTP 0.2 μL , 20 μM primer forward 0.2 μL , 20 μM primer reward 0.2 μL , 5 unit Taq DNA polymerase 0.1 μL , DNA template 50 nG ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 0.2 mL นำเข้าเครื่อง PCR และกำหนดเงื่อนไขดังนี้ คือ 94°C นาน 2 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94°C นาน 30 วินาที 55°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 72°C นาน 10 นาที 1 รอบ (ภาคผนวก 8)

นำ PCR product ไปตรวจสอบด้วย 10 % polyacrylamide gel electrophoresis นำเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide 5 μL /TBE buffer 100 mL เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาลอยด์เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

ภาคผนวก 8 เงื่อนไข PCR ในการวิเคราะห์ Microsatellite



ภาคผนวก 9 ชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) ของ University of British Columbia (UBC) ที่ใช้ในงานทดลองในเทคนิค RAPD

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส
101	5'-----3' GCG GCT GGA G
119	ATT GGG CGA T
173	CAG GCG GCG T
241	GCC CGA CGC G

ภาคผนวก 10 สูตรการเตรียม Extraction buffer

	stock	ถ้าเตรียมปริมาตร 10 mL
1. 2% CTAB	-	0.2 g
2. 100 mM Tris-Hcl pH 8.0	1.0 M	1.0 mL
3. 20 mM EDTA pH 8.0	0.5 M	0.4 mL
4. 1.4 M Nacl	5.0 M	2.8 mL
5. 0.4% β-mercaptoethanol	100%	40.0 μL
6. H ₂ O	-	6.0 mL

ภาคผนวก 11 สูตรการเตรียม TE buffer

1. 10 mM Tris-HCL pH 8.0
2. 1 mM EDTA pH 8.0

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก 12 สูตรการเตรียม TE buffer (stock 1000 mL)

- | | | |
|----------------------|------|----|
| 1. Tris base | 54 | g |
| 2. Boric acid | 27.5 | g |
| 3. 0.5 M EDTA pH 8.0 | 20 | mL |

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 1000 mL เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก 13 สูตรการเตรียม Loading dye

1. 0.25% Bromophenol blue
2. 0.25% Xylene cyanol
3. 40% Sucrose

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

ภาคผนวก 14 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987)

1. นำตัวอย่างใบข้าวที่บดละเอียด 0.1 g ใส่ลงใน eppendorf tube ที่มี extraction buffer ปริมาตร 800 μ L vortex ประมาณ 10 วินาที
2. นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลาประมาณ 1.5 – 2 ชั่วโมง พลิกกลับไปมาทุกๆ 15 นาที
3. เติม Chloroform: Isoamyl (24:1) ประมาณ 600 μ L
4. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที
5. ดูด supernatant ใส่ tube จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl (24:1) ประมาณ 600 μ L พลิกตลอดไปมา 5 นาที
6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที
7. ดูด supernatant ใส่ tube ขนาด 1.5 mL

8. ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม isopropanol ประมาณ 0.7 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1 คืน
9. นำเอาสารละลายจากข้อ 8 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
10. เทสารละลายทิ้ง โดยระหว่างเทระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดตกไปด้วย ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% ethanol ประมาณ 200 μL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
11. เทสารละลายใส่ด้านบนทิ้งและคว่ำ tube ลงบนกระดาษทิชชูเพื่อให้ของเหลวที่ค้างอยู่ระเหยออกจนหมด (air dry) ทิ้งไว้ประมาณ 2 – 3 ชั่วโมงหรือจนกว่าดีเอ็นเอจะแห้งหมาดๆ
12. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE beffer 50 μL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายนานประมาณครึ่งชั่วโมง
13. เติม Rnase A 25 mg/mL ปริมาณ 5 μL ในหลอดที่ละลายดีเอ็นเอไว้ แล้วนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง (อาจตรวจสอบว่ายังคงมีอาร์เอ็นเอหลงเหลืออยู่หรือไม่ โดยตรวจด้วยการทำ gel electrophoresis)
14. นำเอาสารจากข้อ 13 เติม Chloroform: Isoamyl (24:1) ประมาณ 400 μL พลิกหลอดไปมา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
15. ดูด supernatant ใส่ tube ใหม่
16. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol ประมาณ 2 – 2.5 เท่า ที่ -20°C นาน 1 คืน
17. นำสารละลายจากข้อ 16 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
18. เทสารละลายทิ้ง ระหว่างเทระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดตกลงไปด้วย แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม 70% ethanol ประมาณ 200 μL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
19. เทสารละลายใส่ด้านบนทิ้งและคว่ำ tube ลงบนกระดาษทิชชูเพื่อให้ของเหลวที่ค้างอยู่ระเหยออกจนหมด (air dry) ทิ้งไว้ประมาณ 2 – 3 ชั่วโมงหรือจนกว่าดีเอ็นเอจะแห้งหมาดๆ
20. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE beffer 50 μL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ดีเอ็นเอละลายนานประมาณครึ่งชั่วโมง
21. ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้ โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis
22. เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียส

ภาคผนวก 15 ขั้นตอนการทำ 2.0% agarose gel electrophoresis

1. นำเอากรดเจลมาเช็ดด้วย 70% ethanol ให้สะอาด
2. ปิดเทปพลาสติกใสทั้ง 2 ด้าน
3. วางหวีเสียบ (comb) ลงที่ปลายข้างหนึ่งเพื่อทำให้เจลที่แข็งเกิดช่อง (well) ที่จะใช้ในการหยอดดีเอ็นเอตัวอย่างลงไป
4. ชั่ง agarose 2.0 g ผสมกับ 1X TBE buffer ปริมาตร 100 mL หลอมให้ละลาย ทิ้งไว้จน agarose gel ที่หลอมไว้อุ่นจนสามารถจับได้ด้วยมือ
5. เท agarose gel ที่หลอมแล้วนั้นลงไปบนถาดให้มีความหนาประมาณ 5 mm ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
6. จากนั้นเท TBE buffer ลงไปเล็กน้อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วดึงหวีที่เสียบออกและเทพลาสติกออก แล้วนำกรดเจลวางลงในอ่าง (tank) อิเล็กโทรโฟรีซิสที่มี TBE buffer อยู่ โดยให้ด้านที่มีช่อง (well) สำหรับหยอดดีเอ็นเอตัวอย่างอยู่ทางด้านขั้วลบ
7. หยอดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมกับ 1X loading dye ลงในช่อง (well) ของ agarose gel ที่เตรียมไว้
8. ปิดฝาอ่าง และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก แล้วเดินเครื่องโดยใช้กระแสไฟแรง 80 Volt ปล่อยให้ 1-2 ชั่วโมง หรือวัดระยะทางของแถบสีแถบบนที่เคลื่อนลงมาประมาณ 4 ซม. แล้วนำเจลแช่ลงใน TBE buffer ข้อมสียดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide 5 μ L/TBE buffer 100 mL นานประมาณ 15 นาที แล้วนำเจลที่ได้ไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลารอยด์เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายเทอดศักดิ์ อนุภาส
วัน เดือน ปีเกิด	20 ธันวาคม 2521
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนจักรคำคณาทร จังหวัดลำพูน เมื่อปีการศึกษา 2539 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชา พืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved