# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการควบคุมและกระจายตัวทางพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความแตกต่างของลักษณะป่าและปลูกในข้าว ศึกษาในลูกผสมชั่วที่ 2 ดำเนินการที่ภาควิชาพืชไร่และศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เริ่มทดลองตั้งแต่กรกฎาคม 2548 และสิ้นสุดเดือน เมษายน 2550

**พันธุกรรม**

ศึกษาในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่างข้าวป่าปราจีนบุรี (*O. rufipogon*) และข้าวปลูกจำนวน 3 พันธุ์ โดยมีรายละเอียดแสดงในตาราง 3.1

**ตารางที่ 3.1** รายชื่อพันธุ์ pedigree และรายละเอียดของพันธุ์พ่อแม่

| พันธุ์ข้าว/ประชากรข้าวป่า | Pedigree/description |
|---|---|
| ข้าวป่าปราจีนบุรี (*O. rufipogon*) | ข้าวป่าสามัญชนิดหลายฤดู (perennial type) จากแปลงอนุรักษ์ข้าวป่าในศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี ต. บ้านสร้าง อ. บ้านสร้าง จ. ปราจีนบุรี |
| ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) | คัดเลือกแบบ Pure line selection จากการรวบรวมรวงข้าวจำนวน 199 รวงจนได้สายพันธุ์ขาวมะลิ 4-2-105 เลข 2 หมายถึง พันธุ์ทดสอบที่ และเลข 105 หมายถึง แถวหรือรวงที่ 105 |
| สุพรรณบุรี 1 (SPR1) | IR25393-57-2-3 / RD 23 / / IR27316-96-3-2-2 / / / SPRLR77205-3-2-1-1 / SPRLR79134-51-2-2 |
| ปทุมธานี 60 (PTT60) | Dawk Mali 70 / Chinese345 |

โดยเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณวิไลลักษณ์ สมมุติ ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรีโดยใช้ข้าวป่าเป็นพันธุ์พ่อและข้าวปลูกเป็นพันธุ์แม่ในการสร้างลูกผสม จำนวน 3 คู่ผสมได้แก่

คู่ผสมที่1 ขาวดอกมะลิ 105 ×*O. rufipogon*

คู่ผสมที่2 สุพรรณบุรี 1 × *O. rufipogon*

คู่ผสมที่3 ปทุมธานี 60 × *O. rufipogon*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ภาควิชาพืชไร่ โดยปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตรที่บรรจุดินไว้ประมาณ 4/5 ของกระถาง ปลูกจำนวนคู่ผสมละ 20 ต้น ในระยะออกรวงใช้ถุงไขสีขาวคลุมรวงข้าวแต่ละรวง เมื่อถึงระยะสุกแก่แล้วเก็บเกี่ยวเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อใช้ปลูกในการทดลอง

**วิธีการทดลอง**

นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 ทั้ง 3 คู่ผสมและพันธุ์พ่อแม่เพาะบนกระดาษกรองชุบน้ำจนชุ่มใน Petri dishes บันทึกอัตราการงอกของเมล็ดหลังเพาะ 7 วัน หลังจากนั้นย้ายต้นอ่อนที่สมบูรณ์ลงปลูกในกระถางพลาสติกเหมือนที่ใช้ในลูกผสมชั่วที่ 1 ปลูกกระถางละ 10 ต้น โดยปลูกพันธุ์พ่อแม่พันธุ์ละ 50 ต้นและลูกผสมชั่วที่ 2 คู่ผสมละ 200 ต้น ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ หลังย้ายปลูก 30, 60 และ 75 วัน เมื่อต้นข้าวอายุประมาณ 5 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างใบข้าวแยกแต่ละต้น เลือกใบที่ค่อนข้างอ่อนเก็บใส่ถุงเก็บตัวอย่างและใส่ใน silica gel ที่มีภาชนะปิดอยู่ทันทีเพื่อดูดความชื้นเพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอในใบที่จะใช้สำหรับสกัดเพื่อนำไปวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลต่อไป จากนั้นบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาแยกแต่ละต้นทุกต้นที่ระยะต่างๆของการเจริญเติบโตโดยบันทึกตามแบบบันทึกลักษณะข้าวป่าศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ (สงกรานต์ 2538) ดังนี้

<u>ระยะแตกกอ</u> บันทึกลักษณะทรงกอ สีกาบใบ สีแผ่นใบ สีลิ้นใบ รูปร่างลิ้นใบ สีเขี้ยวใบจำนวนหน่อต่อต้น

<u>ระยะออกรวง</u> บันทึกวันออกดอกเมื่อออกดอกได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ สีข้อ สีปล้อง สีเกสรตัวเมีย ความยาวเกสรตัวผู้ สียอดดอก การมีหางของเมล็ด สีหาง และใช้ถุงไขสีขาวคลุมรวงข้าวแต่ละต้นละ 2 รวง เพื่อป้องกันการร่วงหล่นของเมล็ดก่อนการเก็บเกี่ยว

<u>ระยะเก็บเกี่ยว</u> บันทึกความสูงจากพื้นดินถึงคอรวงของต้นข้าวแต่ละต้นที่ระยะเก็บเกี่ยว โดยวัดจากระยะพื้นดินจนถึงคอรวง แยกเก็บเกี่ยวรวงข้าวแต่ละต้นสุ่มเก็บตัวอย่างรวงที่คลุมด้วยถุงไข นำมาวัดความยาวรวง จำนวนระแง้ เมล็ดดี และเมล็ดร่วงทั้งหมด นำเมล็ดมารวงละ 5 เมล็ด วัดความกว้างยาวของเมล็ดและบันทึกลักษณะสีเปลือกและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

โดยให้คะแนนการบันทึกลักษณะต่างๆ ดังนี้

ลักษณะทรงกอ (1 = กอตั้ง 5 = กอเอน 9 = แผ่-นอน)

สีกาบใบ (1 = เขียว 2 = เขียวเข้ม 3 = ม่วงอ่อน 4 = ม่วง)

สีแผ่นใบ (1 = เขียว 2 = เขียวเข้ม 3 = ม่วงที่ปลาย 4 = ม่วงที่ริม 5 = ม่วงทั้งใบ)

สีลิ้นใบ (1 = ไม่มีสี 2 = สีม่วง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปร่างลิ้นใบ (1 = แหลม 2 = มี 2 ยอด 3 = ไม่แหลม)

สีเขี้ยวใบ (1 = ไม่มีสี 2 = สีม่วง)

สีข้อ (1= เขียว 2 = ม่วง 3 = ม่วงอ่อน)

สีปล้อง (1 = เขียว 2 = เหลืองอ่อน 3 = เขียวมีเส้นม่วง 4 = ม่วง)

สีเกสรตัวเมีย (1 = ขาว 2 = แดง 3 = ม่วง 4 = ดำ)

สียอดดอก (1 = ขาว 2 = น้ำตาล 3 = แดง 4 = ม่วงดำ)

ขนาดเกสรตัวผู้ (1 = 1/4 ของเมล็ด 2 =1/2 ของเมล็ด 3 = 3/4 ของเมล็ด 4 = เต็มเมล็ด)

การมีหาง (1 = ไม่มี 2 = มี)

สีหาง (1 = ขาว 2 = เหลือง 3 = เขียวมีเส้นม่วง 4 = ม่วง X = อื่นๆ)

สีเปลือกเมล็ด (1 = ฟาง 2 = เหลือง 3 = แดง 4= น้ำตาลดำ 5 = ดำ 6 = ม่วง)

สีเยื่อหุ้มเมล็ด (1 = ขาว 2 = แดง 3 = ดำ)

หลังจากเก็บเกี่ยวตัดต้นข้าวให้สูงจากระดับผิวดินประมาณ 5 – 10 ซม. จากนั้นบันทึกลักษณะความสามารถในการเจริญหลังการเก็บเกี่ยวของต้นข้าวแต่ละต้น

**การวิเคราะห์ DNA**

นำตัวอย่างใบแห้งของพันธุ์พ่อแม่ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ทั้ง 3 คู่ผสมและประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวป่า *O. rufipogon* และข้าวปลูกสุพรรณบุรี 1 นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แยกตัวอย่างแต่ละต้นและบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เทตัวอย่างใส่ในหลอด eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Xie *et al* (1999) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาละลายด้วย TE buffer เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 $^{0}$C และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองโดยใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) และเทคนิค microsatelite markers โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 66 ตัว (ตารางที่ 3.2)

ปฏิกิริยา PCR มีหลักการทำงานคือขั้นแรกทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation)โดยการใช้อุณหภูมิสูงที่ 94 -95 ˚C ขั้นที่สองลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ primer จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (primer annealing) ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ในช่วง 48-67 ˚C ขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของเบสในไพรเมอร์ที่ใช้ และขั้นสุดท้าย เอนไซม์ Tag polymerase จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ ดีเอ็นเอและอุณหภูมิที่ใช้เพื่อให้เอนไซม์ ทำงานได้ดีที่สุดคือ 72 ˚C เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ทำซ้ำประมาณ 30-40 รอบก็

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้เพียงพอที่จะนำไปวิเคราะห์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ได้ไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย ด้วย 10% polyacrelamide gel electrophoresis นำแผ่น gel ที่ได้ไปย้อมสีด้วย Ethidium bromide เพื่อดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transiluminitor และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล เพื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) ในพันธุ์พ่อแม่ระหว่างข้าวป่า *O. rufipogon* กับข้าวปลูก 3 พันธุ์ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 1 และปทุมธานี 60 และในลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่างข้าวป่า *O. rufipogon* และข้าวปลูกสุพรรณบุรี 1 โดยแบ่งลูกผสมชั่วที่ 2 เป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มต้นที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การร่วงของเมล็ดที่มีค่าสูงสุด และต่ำสุดอย่างละ 5 ตัวอย่าง นำมาผสมกันในปริมาณตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตรให้เป็นตัวแทนประชากรที่มีลักษณะร่วงและไม่ร่วงของเมล็ดโดยดัดแปลงจากวิธี Bulk Segregant Analysis (BAS) (Masojc´, 2002)

เลือกไพรเมอร์ที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะการร่วงของเมล็ดในลูกผสมชั่วที่ 2 โดยวิธีการ BAS และไพรเมอร์ที่อยู่บริเวณใกล้กันบนโครโมโซมเดียวกันนำไปศึกษาในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ทั้งหมด 200 ตัวอย่าง

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

<u>ลักษณะทางคุณภาพ (Qualitative traits)</u>

ประเมินการกระจายตัวโดยการจัดกลุ่ม ทดสอบการกระจายตัวโดยใช้ chi-squre test ($\chi^2$) และการจัดกลุ่มลักษณะ (lingkage group) เพื่อหาความสัมพันธ์และระยะห่างระหว่างยีน

<u>ลักษณะทางปริมาณ (Quantitative traits)</u>

คำนวณค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) การกระจายความถี่

<u>ความสัมพันธ์ระหว่าง marker และลักษณะความแตกต่างระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูก</u>

วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยการจัดกลุ่มการกระจายตัวของ marker class เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อแม่ โดยกำหนดให้ลูกผสมชั่วที่ 2 ที่มี allele เหมือนพันธุ์พ่อแทนสัญลักษณ์ด้วย A ลูกผสมชั่วที่ 2 ที่มี allele เหมือนพันธุ์แม่แทนสัญลักษณ์ด้วย B ส่วนลูกผสมชั่วที่ 2 ที่มี allele เหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่แทนสัญลักษณ์เป็น H ทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การร่วงของเมล็ดในแต่ละ microsatellite allele โดยวิธี unpaired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง markers และลักษณะทางปริมาณ (quantitative traits) โดยวิธี Linkage analysis โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MAP Manager QTXb20 ใช้หลักของ maximum likelihood method โดย LOD $\geq$ 3.0 แสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง marker และลักษณะทางปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.2** ชื่อ Microsattelite primer จำนวน 66 ไพรเมอร์ ลำดับเบส ตำแหน่งโครโมโซม และ annealing temperature ที่ใช้ในการศึกษา

| ลำดับ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับเบส | โครโมโซม | Annealing Temperature | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | RM237F | 5'-CAAATCCCGACTGCTGTCC-3' | 1 | 53 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM237R | 5'-TGGGAAGAGAGCACTACAGC-3' | | | |
| 2 | RM246F | 5'-GAGCTCCATCAGCCATTCAG-3' | 1 | 53 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM246R | 5'-CTGAGTGCTGCTGCGACT-3' | | | |
| 3 | RM1F | 5'-GCGAAAACACAATGCAAAAA-3' | 1 | 55 | Panaud *et al*., 1996 |
| | RM1R | 5'-GCGTTGGTTGGACCTGAC-3' | | | |
| 4 | RM212F | 5'-CCACTTTCAGCTACTACCAG-3' | 1 | 55 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM212R | 5'-CACCCATTTGTCTCTCATTATG-3' | | | |
| 5 | RM104F | 5'-GGAAGAGGAGAGAAAGATGTGTGTCG-3' | 1 | 61 | Akagi *et al*., 1997 |
| | RM104R | 5'-TCAACAGACCACACCGCCACCGC-3' | | | |
| 6 | RM341F | 5'-CAAGAAACCTCAATCCGAGC-3' | 2 | 53 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM341R | 5'-CTCCTCCCGATCCCAATC-3' | | | |
| 7 | RM48F | 5'-TGTCCCACTGCTTTCAAGC-3' | 2 | 53 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM48R | 5'-CGAGAATGAGGGACAAATAACC-3' | | | |
| 8 | RM211F | 5'-CCGATCTCATCAACCAACTG-3' | 2 | 55 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM211R | 5'-CTTCACGAGGATCTCAAAGG-3' | | | |
| 9 | RM6F | 5'-GTCCCCTCCACCCAATTC-3' | 2 | 55 | Panaud *et al*., 1996 |
| | RM6R | 5'-TCGTCTACTGTTGGCTGCAC-3' | | | |
| 10 | RM203F | 5'-CCTATCCCATTAGCCAAACATTGC-3' | 2 | 60 | Akagi *et al*., 1996 |
| | RM203R | 5'-GATTTACCTCGACGCCAACCTG-3' | | | |
| 11 | RM145F | 5'-CCGGTAGGCGCCCTGCAGTTTC-3' | 2 | 65 | Akagi *et al*., 1996 |
| | RM145R | 5'-CAAGGACCCCATCCTCGGCGTCGTC-3' | | | |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.2 (ต่อ)**

| ลำดับ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับเบส | โครโมโซม | Annealing Temperature | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| 12 | RM22F | 5'-GGTTTGGGAGCCCATAATCT-3' | 3 | 55 | Panaud *et al*., 1996 |
| | RM22R | 5'-CTGGGCTTCTTTCACTCGTC-3' | | | |
| 13 | RM55F | 5'-CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG-3' | 3 | 55 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM55R | 5'-TCCCGGTTATTTTAAGGCG-3' | | | |
| 14 | RM546F | 5'-GAGATGTAGACGTAGACGGCG-3' | 3 | 57 | Temnykh *et al*., 2001 |
| | RM546R | 5'-GATCATCGTCCTTCCTCTGC-3' | | | |
| 15 | RM143F | 5'-GTCCCGAACCCTAGCCCGAGGG-3' | 3 | 67 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM143R | 5'-AGAGGCCCTCCACATGGCGACC-3' | | | |
| 16 | RM303F | 5'-GCATGGCCAAATATTAAAGG-3' | 4 | 50 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM303R | 5'-GGTTGGAAATAGAAGTTCGGT-3' | | | |
| 17 | RM280F | 5'-ACACGATCCACTTTGCGC-3' | 4 | 50 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM280R | 5'-TGTGTCTTGAGCAGCCAGG-3' | | | |
| 18 | RM335F | 5'-GTACACACCCACATCGAGAAG-3' | 4 | 55 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM335R | 5'-GCTCTATGCGAGTATCCATGG-3' | | | |
| 19 | RM241F | 5'-GAGCCAAATAAGATCGCTGA-3' | 4 | 55 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM241R | 5'-TGCAAGCAGCAGATTTAGTG-3' | | | |
| 20 | RM348F | 5'-CCGCTACTAATAGCAGAGAG-3' | 4 | 55 | Blight *et al*., 1999 |
| | RM348R | 5'-GGAGCTTTGTTCTTGCGAAC-3' | | | |
| 21 | RM349F | 5'-TTGCCATTCGCGTGGAGGCG-3' | 4 | 57 | Blight *et al*., 1999 |
| | RM349R | 5'-GTCCATCATCCCTATGGT-3' | | | |
| 22 | RM273F | 5'-GAAGCCGTCGTGAAGTTACC-3' | 4 | 67 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM273R | 5'-GTTTCCTACCTGATCGCGAC-3' | | | |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.2 (ต่อ)**

| ลำดับ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับเบส | โครโมโซม | Annealing Temperature | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| 23 | RM131F | 5’-TCCTCCCTCCCTTCGCCCACTG-3' | 4 | 67 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM131R | 5'-CGATGTTCGCCATGGCTGCTCC-3' | | | |
| 24 | RM124F | 5'-ATCGTCTGCGTTGCGGCTGCTG-3' | 4 | 67 | Temnykh *et al*., 2001 |
| | RM124R | 5'-CATGGATCACGAGCTCCCCCC-3' | | | |
| 25 | RM13F | 5'-TCCAACATGGCAAGAGAGAG-3' | 5 | 50 | Temnykh *et al*., 2001 |
| | RM13R | 5'-GGTGGCATTCGATTCCAG-3' | | | |
| 26 | RM122F | 5'-GAGTCGATGTAATGTCATCAGTGC-3' | 5 | 55 | Wu *et al*., 1993 |
| | RM122R | 5'-GAAGGAGGTATCGCTTTGTTGGAC-3' | | | |
| 27 | RM153F | 5'-GCCTCGAGCATCATCATCAG-3' | 5 | 57 | Akagi *et al*., 1996 |
| | RM153R | 5'-ATCAACCTGCACTTGCCTGG-3' | | | |
| 28 | RM164F | 5'-TCTTGCCCGTCACTGCAGATATCC-3' | 5 | 58 | Wu *et al*., 1993 |
| | RM164R | 5'-GCAGCCCTAATGCTACAATTCTTC-3' | | | |
| 29 | RM178F | 5'-TCGCGTGAAAGATAAGCGGCGC-3' | 5 | 65 | Temnykh *et al*., 2001 |
| | RM178R | 5'-GATCACCGTTCCCTCCGCCTGC-3' | | | |
| 30 | RM190F | 5'-CTTTGTCTATCTCAAGACAC-3' | 6 | 48 | Akagi *et al*., 1996 |
| | RM190R | 5'-TTGCAGATGTTCTTCCTGATG-3' | | | |
| 31 | RM225F | 5'-TGCCCATATGGTCTGGATG-3' | 6 | 53 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM225R | 5'-GAAAGTGGATCAGGAAGGC-3' | | | |
| 32 | RM253F | 5'-TCCTTCAAGAGTGCAAAACC-3' | 6 | 58 | unknow |
| | RM253R | 5'-GCATTGTCATGTCGAAGCC-3' | | | |
| 33 | RM103F | 5'-CTTCCAATTCAGGCCGGCTGGC-3' | 6 | 60 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM103R | 5'-CGCCACAGCTGACCATGCATGC-3' | | | |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.2 (ต่อ)**

| ลำดับ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับเบส | โครโมโซม | Annealing Temperature | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| 34 | RM170F | 5'-TCGCGCTTCCTCGTCGACG-3' | 6 | 60 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM170R | 5'-CCCGCTTGCAGAGGAAGCAGCC-3' | | | |
| 35 | RM586F | 5'-ACCTCGCGTTATTAGGTACCC-3' | 6 | 60 | Temnykh *et al*., 2001 |
| | RM586R | 5'-GAGATACGCCAACGAGATACC-3' | | | |
| 36 | RM11F | 5'-TCTCCTCTTCCCCCGATC-3' | 7 | 53 | Panaud *et al*., 1996 |
| | RM11R | 5'-ATAGCGGGCGAGGCTTAG-3' | | | |
| 37 | RM10F | 5'-TTGTCAAGAGGAGGCATCG-3' | 7 | 53 | Panaud *et al*., 1996 |
| | RM10R | 5'-CAGAATGGGAAATGGGTCC-3' | | | |
| 38 | RM436F | 5'-ATTCCTGCAGTAAAGCACGG-3' | 7 | 55 | Temnykh *et al*., 2001 |
| | RM436R | 5'-CTTCGTGTACCTCCCCAAAC-3' | | | |
| 39 | RM295F | 5'-CGAGACGAGCATCGGATAAG-3' | 7 | 60 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM295R | 5'-GAGGGTACAACTTAGGACGCA-3' | | | |
| 40 | RM118F | 5'-CCAATCGGAGCCACCGGAGAGC-3' | 7 | 67 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM118R | 5'-CACATCCTCCAGCGACGCCGAG-3' | | | |
| 41 | RM256F | 5'-GACAGGGAGTGATTGAAGGC-3' | 8 | 50 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM256R | 5'-GTTGATTTCGCCAAGGGC-3' | | | |
| 42 | RM52F | 5'-CTACTCGCGCGTGGAGTT-3' | 8 | 53 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM52R | 5'-TGTCTTACTGGTGAAGCTGG-3' | | | |
| 43 | RM38F | 5'-ACGAGCTCTCGATCAGCCTA-3' | 8 | 50 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM38R | 5'-TCGGTCTCCATGTCCCAC-3' | | | |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.2 (ต่อ)**

| ลำดับ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับเบส | โครโมโซม | Annealing Temperature | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| 44 | RM44F | 5'-ACGGGCAATCCGAACAACC-3' | 8 | 55 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM44R | 5'-TCGGGAAAACCTACCCTACC-3' | | | |
| 45 | RM149F | 5'-GCTGACCAACGAACCTAGGCCG-3' | 8 | 55 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM149R | 5'-GTTGGAAGCCTTTCCTCGTAACACG-3' | | | |
| 46 | RM25F | 5'-GGAAAGAATGATCTTTTCATGG-3' | 8 | 55 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM25R | 5'-CTACCATCAAAACCAATGTTC-3 ' | | | |
| 47 | RM223F | 5'-GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC-3' | 8 | 57 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM223R | 5'-GAAGGCAAGTCTTGGCACTG-3' | | | |
| 48 | RM245F | 5'-ATGCGCCAGTGAATAGC-3' | 9 | 50 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM245R | 5'-CTGAGAATCCAATTATCTGGGG-3' | | | |
| 49 | RM219F | 5'-CGTCGGATGATGTAAAGCCT-3' | 9 | 50 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM219R | 5'-CATATCGGCATTCGCCTG-3' | | | |
| 50 | OSR28F | 5'-AGCAGGTATTAGCTTAGCTTAGCTGG-3' | 9 | 55 | Akagi *et al*., 1996 |
| | OSR28R | 5'-ACTGCACATGAGCAGAGACA-3' | | | |
| 51 | RM321F | 5'-CCAACACTGCCACTCTGTTC-3' | 9 | 55 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM321R | 5'-GAGGATGGACACCTTGATCG-3' | | | |
| 52 | RM316F | 5'-CTAGTTGGGCATACGATGGC-3' | 9 | 57 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM316R | 5' ACGCTTATATGTTACGTCAAC-3' | | | |
| 53 | RM444F | 5'-GCTCCACCTGCTTAAGCATC-3' | 9 | 57 | Temnykh *et al*., 2001 |
| | RM444R | 5'-TGAAGACCATGTTCTGCAGG-3' | | | |
| 54 | RM105F | 5'-GTCGTCGACCCATCGGAGCCAC-3' | 9 | 67 | Temnykh *et al*., 2001 |
| | RM105R | 5'-TGGTCGAGGTGGGGATCGGGTC-3' | | | |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.2 (ต่อ)**

| ลำดับ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับเบส | โครโมโซม | Annealing Temperature | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| 55 | RM474 | 5'-AAGATGTACGGGTGGCATTC-3' | 10 | 55 | unknow |
| | RM474 | 5'-TATGAGCTGGTGAGCAATGG-3' | | | |
| 56 | RM171F | 5'-AACGGAGGACACGTACTTAC-3' | 10 | 55 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM171R | 5'-ACGAGATACGTACGCCTTTG-3' | | | |
| 57 | RM294F | 5'-TTGGCCTAGTGCCTCCAATC-3' | 10 | 57 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM294R | 5'-GAGGGTACAACTTAGGACGCA-3' | | | |
| 58 | RM184F | 5'-ATCCCATTCGCAAAACCGGCC-3' | 10 | 65 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM184R | 5'-TGACACTTGGAGAGCGGTGTGG-3' | | | |
| 59 | RM167F | 5'-GATCCAGCGTGAGGAACACGT-3' | 11 | 55 | Wu *et al*.,1993 |
| | RM167R | 5'-AGTCCGACCACAAGGTGCGTTGTC-3' | | | |
| 60 | RM4F | 5'-TTGACGAGGTCAGCACTGAC-3' | 11 | 57 | Temnykh *et al*., 2001 |
| | RM4R | 5'-AGGGTGTATCCGACTCATCG-3' | | | |
| 61 | RM21F | 5'-ACAGTATTCCGTAGGCACGG-3' | 11 | 57 | Panaud *et al*., 1996 |
| | RM21R | 5'-GCTCCATGAGGGTGGTAGAG-3' | | | |
| 62 | RM144F | 5'-TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC-3' | 11 | 62 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM144R | 5'-GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG-3' | | | |
| 63 | RM260F | 5'-ACTCCACTATGACCCAGAG-3' | 12 | 55 | Chen *et al*., 1997 |
| | RM260R | 5'-GAACAATCCCTTCTACGATCG-3' | | | |
| 64 | RM20F | 5'-ATCTTGTCCCTGCAGGTCAT-3' | 11 | 53 | Panaud *et al*.,1996 |
| | RM20R | 5'-GAAACAGAGGCAATTTCATTG-3' | | | |
| 65 | RM270F | 5'-GGCCGTTGGTTCTAAAATC-3' | 12 | 55 | Temnykh *et al*.,2001 |
| | RM270R | 5'-GCAAATGCGCCTCGTGTC-3' | | | |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.2 (ต่อ)**

| ลำดับ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับเบส | โครโมโซม | Annealing Temperature | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| 66 | RM117F | 5'-CGATCCATTCCTGCTGCTCGCG-3' | 12 | 67 | Temnykh *et al*., 2000 |
| | RM117R | 5'-CGCCCCCATGCATGAGAAGACG-3' | | | |



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved