ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 1 การประเมินลักษณะทางสัณฐาน (IRRI – IBPRG, 1980)

ลักษณะ	**เกณฑ์การประเมิน**
1. สีแผ่นใบ	(1) เขียวอ่อน
	(2) เขียว
	(3) เขียวเข้ม
	(4) ม่วงที่ปลาย
	(5) ม่วงที่ริม (ขอบ)
	(6) ม่วงผสมเขียว
	(7) ม่วงทั้งใบ
2. สีกาบใบ	(1) เขียว
	(2) เขียวเส้นม่วง
	(3) ม่วงอ่อน
	(4) ม่วง
3. การมีขนบนแผ่นใบ	(1) ไม่มีขน
	(2) มีขนบ้าง
	(3) มีขน
4. สีข้อ	(1) เขียวอ่อน
	(2) เขียว
	(3) ม่วง
5. สีปล้อง	(1) เขียว
	(2) เหลืองอ่อน
	(3) เขียวเส้นม่วง
	(4) ม่วง
6. สีข้อต่อใบ	(1) เขียวอ่อน
	(2) เขียว
	(3) ม่วง
7. มุมของยอดแผ่นใบ	(1) ตั้งตรง
	(5) นอน
	(9) ตก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. สีของเยื่อกันน้ำฝน	(1) ขาว
	(2) ขาวเส้นม่วง
	(3) ม่วง
9. รูปร่างเยื่อกันน้ำฝน	(1) แหลม
	(2) มี 2 ยอด
	(3) ไม่แหลม
10. สีเขี้ยวกันแมลง	(1) เขียว
	(2) ม่วง
11. ลักษณะทรงกอ	(1) ตั้งตรง
	(3) เอนเล็กน้อย
	(5) เอน
	(7) เอนมาก
	(9) นอน
12. มุมของใบธง	(1) ตั้งตรง
	(3) เอน
	(5) นอน
	(7) ตก
13. สียอดเกสรตัวเมีย	(1) ขาว
	(2) เขียวอ่อน
	(3) เหลือง
	(4) ม่วงอ่อน
	(5) ม่วงดำ
14. สียอดดอก	(1) ขาว
	(2) ฟาง
	(3) น้ำตาล
	(4) แดง
	(5) ชมพู
	(6) ม่วง
	(7) ม่วงดำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

15. สีกลีบรองดอก	(1) ฟาง
	(2) เหลือง
	(3) แดง
	(4) ม่วง – ดำ
	(5) น้ำตาล
16. การชูรวง	(1) ชูรวงดีมาก
	(3) ชูรวงดี
	(5) โผล่เล็กน้อย
	(7) บางส่วนโผล่
	(9) ไม่โผล่
17. ก้านของรวง	(1) ตั้งตรง
	(2) อ่อน
18. การแห้งของใบธง	(1) แห้งช้า
	(5) แห้งปานกลาง
	(9) แห้งเร็ว
19. การติดเมล็ด	(1) ติดเมล็ดมาก (> 90%)
	(3) ติดเมล็ดปานกลาง (75 – 90 %)
	(5) ติดเมล็ดน้อย (50 – 74 %)
	(7) ติดเมล็ดน้อยกว่า 50%
	(9) ไม่ติดเมล็ด (0%)
20. การร่วงของเมล็ด	(1) ร่วงยากหรือร่วงน้อยกว่า 1%
	(3) ร่วงน้อยหรือร่วง 1-5%
	(5) ร่วงปานกลางหรือร่วง 6-25%
	(7) ร่วงง่ายหรือร่วง 26-50%
	(9) ร่วงง่ายมากหรือร่วงมากกว่า 50%
21. การนวด	(1) นวดยาก
	(5) นวดยากปานกลาง
	(9) นวดง่าย
22. หางข้าว	(0) ไม่มี
	(1) สั้นและมีบางเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

	(5) สั้นและมีทุกเมล็ด
	(7) ยาวและมีบางเมล็ด
	(9) ยาวและมีทุกเมล็ด
23. สีของหางข้าว	(1) ฟาง
	(2) เหลือง
	(3) น้ำตาล
	(4) แดง
	(5) ม่วง
	(6) ดำ
24. สีเปลือกเมล็ด	(1) ฟาง
	(2) ฟางสลับน้ำตาล
	(3) น้ำตาลเข้มขีดเหลือง
	(4) ฟางกระน้ำตาล
	(5) ม่วง
25. การมีขนบนเปลือกเมล็ด	(1) ไม่มีขน
	(2) มีขนบนกลีบเมล็ดใหญ่ด้านล่าง
	(3) มีขนบนกลีบเมล็ดใหญ่ด้านบน
	(4) มีขนสั้น
	(5) มีขนยาว
26. ความยาวของกลีบรองเมล็ด	(1) สั้น (น้อยกว่า 1.5 mm)
	(3) ปานกลาง (1.6 – 2.5 mm)
	(5) ยาว (มากกว่า 1.5 mm)
	(7) ยาวเท่ากับความยาวของดอก
	(9) ยาวไม่เท่ากัน
27. สีเยื่อหุ้มเมล็ด	(1) ขาว
	(2) แดง
	(3) น้ำตาล
	(4) น้ำตาลเข้ม
28. ชนิดของแป้ง	(1) ข้าวเจ้า
	(2) ข้าวเหนียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 2 การเตรียม Extraction buffer

	Stock solution	**เตรียมปริมาตร 50 ml**
4% CTAB	-	2 g
100 mM Tris–HCl pH 8.0	1 M	5 ml
20 mM EDTA pH 8.0	0.5 M	2 ml
1.4 M NaCl	5 M	14 ml
0.4% β-mercaptoethanol	100%	0.2 ml
H_2O	-	29 ml

ภาคผนวก 3 การเตรียม TE buffer

	Stock solution	**เตรียมปริมาตร 200 ml**
10 mM Tris–HCl pH 8.0	2 M	1 ml
1 mM EDTA pH 8.0	0.5 M	400 µl

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 200 ml

ภาคผนวก 4 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Xie *et al*. (1999)

เก็บตัวอย่างใบข้าวที่อายุ 20 วันของตัวอย่างพืชที่ต้องการลงในซองและนำไปลดความชื้นในซิลิกาเจลเป็นเวลา 1-2 วัน และนำตัวอย่างใบข้าวที่ลดความชื้นแล้วมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

1. นำตัวอย่างใบข้าวบดละเอียดมาประมาณ 200 mg บรรจุลงในหลอดขนาดเล็กเติม extraction buffer 1 ml นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงให้ผสมเข้าด้วยกัน
2. นำหลอดไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยพลิกหลอดทุกๆ 30 นาที
3. เมื่อครบ 2 ชั่วโมงนำหลอดมาปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
4. ดูดสารละลายด้านบนมา 0.7 ml ใส่ในหลอดใหม่
5. เติม Chloroform : Isoamyalcohol (24 : 1) 700 µl
6. พลิกหลอดกลับไปมาช้าๆ นาน 5 นาที
7. นำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8. ดูดสารละลายใสด้านบนมาใส่ในหลอดใหม่ เติม NaOAC 100 µl ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 0.6 x Isopropanol (0.6 ml) พลิกให้เข้ากันเบาๆ และทิ้งไว้หนึ่งคืนในตู้ -20 องศาเซลเซียส

9. ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายใสด้านบนทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอตกไปด้วย

10. ล้างดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH 500 µl ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

11. ล้างดีเอ็นเอด้วย 95% EtOH 500 µl ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำ Air dry โดยเปิดฝาคว่ำบนทิชชู่ ครึ่งชั่วโมง

12. เติม TE 50 µl แล้วนำไปแช่ในตู้ -20 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมทำ PCR

ภาคผนวก 5 ปฏิกิริยา PCR

1. เจือจาง DNA : น้ำ = 1 : 9
2. เตรียม cocktail mix สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR โดย 1 หลอดมีส่วนประกอบดังนี้

H_2O	15 µl
10x buffer	2 µl
25 mM $MgCl_2$	2 µl
25 mM dNTP	0.16 µl
20 µM Primer F	0.2 µl
20 µM Primer R	0.2 µl
5 Unit *Taq* DNA Polymerase	0.1 µl

3. นำ cocktail mix ใส่ใน tube เล็กประมาณ 19 µl และนำไปแช่ในน้ำแข็ง
4. เตรียม DNA เจือจาง 1 µl
5. นำเข้าเครื่องทำ PCR ประมาณ 3 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 6 ขั้นตอนการเตรียม 3.5% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ PCR product

1. เตรียม 3.5% agarose โดยชั่ง agarose 3.5 g เติม 1x TBE 100 ml นำไปหลอมให้ละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนไม่มีฟอง

2. นำถาดเจลมาเช็ดด้วย 70% ethanol ปิดด้วยสก๊อตเทปทั้งหัวท้าย แล้วนำ comb มาวาง

3. เท agarose gel ลงไปในถาดให้มีความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

4. เมื่อเจลแข็งตัวให้เท 1x TBE ลงบนหน้าเจลทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมงแล้วดึง comb ออก

5. นำถาดเจลวางลงในกล่อง electrophoresis ที่มี TBE buffer อยู่

6. หยอดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมกับ 1x loading dye ลงในช่องของ agarose gel ที่เตรียมไว้

7. ปิดฝากล่องและต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

8. นำแผ่นเจลออกมาแช่ใน ethidium bromide ประมาณ 30 นาทีแล้วนำแผ่นเจลมาดูกับแสง UV ว่าเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือไม่ ถ้าเกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนให้นำดีเอ็นเอตัวอย่างไปทำใน polyacrylamide gel ต่อไป

ภาคผนวก 7 การเตรียม 10% polyacrylamide

	เตรียมปริมาตร 50 ml
Acrylamide : Bis	16.6 ml
5x TBE	10.0 ml
H2O	23 ml
APS	350 µl
TEMED	17.5 ml

ภาคผนวก 8 การเตรียม 4% polyacrylamide

	เตรียม 2 เจล
Mixed (10%)	6.0 ml
5x TBE	1.8 ml
H_2O	13.09 ml
APS	105 µl
TEMED	12 ml

ภาคผนวก 9 การเตรียม 5x TBE buffer

	เตรียมปริมาตร 1000 ml
Tris–Base	54.0 g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Boric acid	27.5 g
0.5M EDTA pH 8.0	20 ml

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml

ภาคผนวก 10 ขั้นตอนการเตรียม polyacrylamide gel

เตรียมแผ่นกระจก 2 แผ่นมาประกอบเข้าด้วยกันโดยให้ด้านที่เคลือบมาประกบกัน นำ agarose มาเทลงในช่องของกระจกประมาณ 2 ml ทิ้งไว้ให้แห้ง นำ 10% polyacrylamide เทลงไปต่อจากชั้นของ agarose ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งให้แห้ง นำ butane มาเทบนหน้าชั้นของ 10% polyacrylamide ประมาณ 2 ml รอให้เจลแบ่งชั้นชัดเจนแล้วดูด butane ทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นใส่ comb ลงไปในช่องกระจก เติม 4% polyacrylamide ให้ถึงขอบกระจกแล้วตั้งไว้เพื่อให้แผ่นเจลเกิดการแข็งตัว แล้วนำไปประกอบเข้ากับเครื่อง electrophoresis โดยเติม 1x TBE ลงไปในแท่น buffer ทั้งด้านล่างและด้านบนให้ท่วมช่อง comb แล้วดึงแผ่น comb ออก ใช้หลอดหยดเขี่ยฟองอากาศในช่องออก นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ PCR แล้วมาหยอดลงในช่องประมาณ 12 µl ต่อขั้วสายไฟแล้วเปิดเครื่อง ใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมง แล้วนำเจลออกมาจากแผ่นกระจก แช่แผ่นเจลใน ethidium bromide ประมาณ 10 – 15 นาทีแล้วนำแผ่นเจลมาดูกับแสง UV แล้วถ่ายภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอเก็บไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววิชุตา ต๊ะใจ
วัน เดือน ปีเกิด	21 สิงหาคม 2525
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนลำปางกัลยาณี อ.เมือง จ.ลำปาง ปีการศึกษา 2542 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2546
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ของโครงการความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved