ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 1 แสดงการกระจายตัวของลักษณะสียอดดอก การมีหาง สีหางและสีเกสรตัวเมีย ของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 2 ของคู่ผสม ขาวดอกมะลิ 105 x *O. rufipogon* (ลำพูน)

สายพันธุ์	สียอดดอก	สีหาง	สีเกสรตัวเมีย
ขาวดอกมะลิ 105	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
O. rufipogon (ลำพูน)	แดง	หางแดง	ขาว-ม่วง
ลูกผสมชั่วที่ 2	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
	ขาว	ไม่มีหาง	ม่วง
	ขาว	หางขาว	ขาว
	ขาว	หางขาว	ม่วง
	แดง	ไม่มีหาง	ม่วง
	แดง	หางขาว	ม่วง
	แดง	หางแดง	ม่วง

ภาคผนวก 2 แสดงการกระจายตัวของลักษณะสียอดดอก การมีหาง สีหางและสีเกสรตัวเมีย ของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 2 ของคู่ผสม ก่ำดอยสะเก็ด x *O. rufipogon* (ลำพูน)

สายพันธุ์	สียอดดอก	สีหาง	สีเกสรตัวเมีย
ก่ำดอยสะเก็ด	แดง	ไม่มีหาง	ม่วง
O. rufipogon (ลำพูน)	แดง	หางแดง	ขาว-ม่วง
ลูกผสมชั่วที่ 2	แดง	ไม่มีหาง	ขาว
	แดง	ไม่มีหาง	ขาวปนแดง
	แดง	ไม่มีหาง	ม่วง
	แดง	หางขาว	ม่วง
	แดง	หางแดง	ขาว
	แดง	หางแดง	ขาวปนแดง
	แดง	หางแดง	ม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 3 แสดงการกระจายตัวของลักษณะสียอดดอก การมีหาง สีหางและสีเกสรตัวเมีย ของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 2 ของคู่ผสม กข 6 x *O. rufipogon* (ลำพูน)

สายพันธุ์	สียอดดอก	สีหาง	สีเกสรตัวเมีย
กข 6	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
O. rufipogon (ลำพูน)	แดง	หางแดง	ขาว-ม่วง
ลูกผสมชั่วที่ 2	ขาว	ไม่มีหาง	ม่วง
	ขาว	หางขาว	ขาว
	ขาว	หางขาว	ม่วง
	แดง	ไม่มีหาง	ขาว
	แดง	ไม่มีหาง	ม่วง
	แดง	หางขาว	ม่วง
	แดง	หางแดง	ม่วง

ภาคผนวก 4 แสดงการกระจายตัวของลักษณะสียอดดอก การมีหาง สีหางและสีเกสรตัวเมีย ของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 2 ของคู่ผสม กข 10 x *O. rufipogon* (ลำพูน)

สายพันธุ์	สียอดดอก	สีหาง	สีเกสรตัวเมีย
กข 10	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
O. rufipogon (ลำพูน)	แดง	หางแดง	ขาว-ม่วง
ลูกผสมชั่วที่ 2	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
	ขาว	หางขาว	ขาว
	ขาว	หางขาว	ม่วง
	ขาว	หางแดง	ม่วง
	แดง	ไม่มีหาง	ม่วง
	แดง	หางขาว	ม่วง
	แดง	หางแดง	ม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 5 แสดงการกระจายตัวของลักษณะสีของดอก การมีหาง สีหางและสีเกสรตัวเมีย ของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 2 ของคู่ผสม เหนียวสันป่าตอง x *O. rufipogon* (ลำพูน)

สายพันธุ์	สีของดอก	สีหาง	สีเกสรตัวเมีย
เหนียวสันป่าตอง	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
O. rufipogon (ลำพูน)	แดง	หางแดง	ขาว-ม่วง
ลูกผสมชั่วที่ 2	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
	ขาว	หางขาว	ขาว
	ขาว	หางขาว	ม่วง
	แดง	ไม่มีหาง	ม่วง
	แดง	หางขาว	ม่วง
	แดง	หางแดง	ม่วง

ภาคผนวก 6 แสดงการกระจายตัวของลักษณะสีของดอก การมีหาง สีหางและสีเกสรตัวเมีย ของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 2 ของคู่ผสม ซิวแม่จัน x *O. rufipogon* (18883)

สายพันธุ์	สีของดอก	สีหาง	สีเกสรตัวเมีย
ซิวแม่จัน	แดง	ไม่มีหาง	ม่วง
O. rufipogon (18883)	ขาว	ขาว	ขาว
ลูกผสมชั่วที่ 2	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
	ขาว	ไม่มีหาง	ม่วง
	ขาว	หางขาว	ขาว
	ขาว	หางแดง	ม่วง
	แดง	ไม่มีหาง	ม่วง
	แดง	หางขาว	ม่วง
	แดง	หางแดง	ม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 7 แสดงการกระจายตัวของลักษณะสียอดดอก การมีหาง สีหางและสีเกสรตัวเมีย ของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 2 ของคู่ผสม ชัยนาท x *O. rufipogon* (18883)

สายพันธุ์	สียอดดอก	สีหาง	สีเกสรตัวเมีย
ชัยนาท	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
O. rufipogon (18883)	ขาว	ขาว	ขาว
ลูกผสมชั่วที่ 2	ขาว	ไม่มีหาง	ขาว
	ขาว	หางขาว	ขาว

ภาคผนวก 8 สูตรการเตรียม Extraction buffer

	stock	ถ้าเตรียมปริมาตร 10 มิลลิลิตร	
1. 2% CTAB	-	0.2	กรัม
2. 100 mM Tris–HCl pH 8.0	1.0 M	1.0	มิลลิลิตร
3. 20 mM EDTA pH 8.0	0.5 M	0.4	มิลลิลิตร
4. 1.4 M NaCl	5.0 M	2.8	มิลลิลิตร
5. 0.4% ß -mercaptoethanol	100%	40.0	ไมโครลิตร
6. H_2O	-	6.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก 9 สูตรการเตรียม TE buffer

1. 10 mM Tris–HCl pH 8.0
2. 1 mM EDTA pH 8.0

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก 10 สูตรการเตรียม TBE buffer (stock 1000 ml)

1. Tris base	54	กรัม
2. Boric acid	27.5	กรัม
3. 0.5 M EDTA pH 8.0	20	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 11 สูตรการเตรียม Loading dye

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

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก 12 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987)

1. นำตัวอย่างใบข้าวที่บดละเอียด 0.1 กรัม ใส่ลงใน eppendrof tube ที่มี extraction buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร vortex ประมาณ 10 วินาที
2. นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1.5 – 2 ชั่วโมง พลิกกลับไปมาทุกๆ 15 นาที
3. เติม Chloroform: Isoamyl (24:1) ประมาณ 600 ไมโครลิตร
4. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที
5. ดูด supernatant ใส่ tube จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl (24:1) ประมาณ 600 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา 5 นาที
6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที
7. ดูด supernatant ใส่ tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
8. ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม isopropanol ประมาณ 0.7 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน
9. นำเอาสารละลายจากข้อ 8 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
10. เทสารละลายทิ้ง โดยระหว่างเทระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดตกไปด้วย ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% ethanol ประมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที
11. เทสารละลายใสด้านบนทิ้งและคว่ำ tube ลงบนกระดาษทิชชูเพื่อให้ของเหลวที่ค้างอยู่ระเหยออกจนหมด (air dry) ทิ้งไว้ประมาณ 2 – 3 ชั่วโมงหรือจนกว่าดีเอ็นเอจะแห้งหมาดๆ
12. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE beffer 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายนานประมาณครึ่งชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13. เติม Rnase A 25 mg/ml ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ในหลอดที่ละลายดีเอ็นเอไว้ แล้วนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง (อาจตรวจสอบว่ายังคงมีอาร์เอ็นเอหลงเหลืออยู่หรือไม่ โดยตรวจด้วยการทำ gel electrophoresis)
14. นำเอาสารจากข้อ 13 เติม Chloroform: Isoamyl (24:1) ประมาณ 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที
15. ดูด supernatant ใส่ tube ใหม่
16. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol ประมาณ 2 – 2.5 เท่า ที่ –20 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน
17. นำสารละลายจากข้อ 16 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
18. เทสารละลายทิ้ง ระหว่างเทระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดตกลงไปด้วย แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม 70% ethanol ประมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที
19. เทสารละลายใสด้านบนทิ้งและคว่ำ tube ลงบนกระดาษทิชชูเพื่อให้ของเหลวที่ค้างอยู่ระเหยออกจนหมด (air dry) ทิ้งไว้ประมาณ 2 – 3 ชั่วโมงหรือจนกว่าดีเอ็นเอจะแห้งหมาดๆ
20. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE beffer 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ดีเอ็นเอละลายนานประมาณครึ่งชั่วโมง
21. ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้ โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis
22. เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก 13 ขั้นตอนการทำ 5% agarose gel electrophoresis

1. นำเอาถาดเจลมาเช็ดด้วย 70% ethanol ให้สะอาด
2. ปิดเทปพลาสติกใสทั้ง 2 ด้าน
3. วางหวีเสียบ (comb) ลงที่ปลายข้างหนึ่งเพื่อทำให้เจลที่แข็งเกิดช่อง (well) ที่จะใช้ในการหยดดีเอ็นเอตัวอย่างลงไป
4. ชั่ง agarose 5 กรัม ผสมกับ 1X TBE buffer ปริมาตร100 มิลลิลิตร หลอมให้ละลาย ทิ้งไว้จน agarose gel ที่หลอมไว้อุ่นจนสามารถจับได้ด้วยมือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. เท agarose gel ที่หลอมแล้วนั้นลงไปบนถาดให้มีความหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
6. จากนั้นเท TBE buffer ลงไปเล็กน้อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วดึงหวีที่เสียบออก แกะเทปพลาสติกออก แล้วนำถาดเจลวางลงในอ่าง (tank) อิเล็กโตรโฟรีซิสที่มี TBE buffer อยู่ โดยให้ด้านที่มีช่อง (well) สำหรับหยอดดีเอ็นเอตัวอย่างอยู่ทางด้านขั้วลบ
7. หยอดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมกับ 1X loading dye ลงในช่อง (well) ของ agarose gel ที่เตรียมไว้
8. ปิดฝาอ่าง และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก แล้วเดินเครื่องโดยใช้กระแสไฟแรง 80 โวลท์ ปล่อยไว้ 1-2 ชั่วโมง หรือวัดระยะทางของแถบสีแถบบนที่เคลื่อนลงมาประมาณ 4 เซนติเมตร แล้วนำเจลแช่ลงใน TBE buffer ย้อมสีดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide 5 µl/TBE buffer 100 ml นานประมาณ 15 นาที แล้วนำเจลที่ได้ไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาลอยด์เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายธีรศักดิ์ สินธุเขียว
วัน เดือน ปีเกิด	22 กันยายน พ.ศ. 2522
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนจักรคำคณาทร จังหวัดลำพูน ปีการศึกษา 2539
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved