ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 1 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. 20mM 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 ml
6. H_2O	-	6.0 ml

ภาคผนวก 2 สูตรการเตรียม TE buffer

1. 10 mM Tris-HCl PH 8.0
2. 1 mM EDTA pH 8.0

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก 3 สูตรการเตรียม TBE buffer (stock 1000 ml)

1. Tris bases	54 g
2. Boric acid	27.5 g
3. 0.5 M EDTA pH 8.0	20 ml

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ได้ 1000 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก 4 สูตรการเตรียม Loading dye

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

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 5 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987)

1. นำตัวอย่างใบข้าวที่บดละเอียดประมาณ 0.1 g ใส่ลงใน eppendrof tube ที่มี extraction buffer ปริมาตร 800 μL จากนั้นนำไป vortex ประมาณ 10 วินาที
2. นำตัวอย่างไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 ^{0}C เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง พลิกกลับไปมา ทุกๆ 15 นาที
3. เติม Chloroform : Isoamyl (24:1) ประมาณ 600 μL
4. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5. ดูด supernatant ใส่ tube จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl (24:1) ประมาณ 600 μL พลิกหลอดไปมา 5 นาที
6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
7. ดูด supernatant ใส่ tube ขนาด 1.5 ml
8. ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม isopropanol ประมาณ 0.7 เท่า จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 ^{0}C นาน 1 คืน
9. นำสารละลายจากข้อ 8 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
10. เทสารละลายทิ้ง โดยระหว่างเทระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดตกไปด้วย จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ประมาณ 200 μl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที
11. เทสารละลายใสด้านบนทิ้ง และคว่ำ tube ลงบนกระดาษทิชชูเพื่อให้ของเหลวที่ค้างอยู่ระเหยออกจนหมด หรือเรียกวิธีนี้ว่า air dry ทิ้งไว้ประมาณ 2 – 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอแห้งหมาดๆ
12. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 50 μl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ดีเอ็นเอละลายประมาณครึ่งชั่วโมง
13. ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis
14. เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ –20 ^{0}C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 6 ขั้นตอนการทำ 1.2% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ

1. เช็ดถาดเจลให้สะอาดด้วย 70% ethanol
2. ปิดเทปพลาสติกทั้ง 2 ด้าน

3. วางหวี (comb) ลงที่ปลายข้างหนึ่งเพื่อทำให้เจลที่แข็งเกิดช่อง (well) ที่จะใช้การหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอลงไป
4. ชั่ง agarose 1.2g ผสมกับ 1X TBE buffer ปริมาตร100 ml หลอมให้ละลายทิ้งไว้จน agarose gel อุ่น
5. เท agarose gel ที่หลอมแล้วลงไปบนถาดให้มีความหนาประมาณ 5 mm ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
6. เท TBE buffer ลงไปเล็กน้อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วดึงหวีที่เสียบออก แกะพลาสติกออก แล้วนำถาดเจลวางลงในอ่าง (tank) อิเล็กโตรโฟรีซิสที่มี TBE buffer อยู่โดยให้ด้านที่มีช่อง (well) สำหรับหยอดดีเอ็นเอตัวอย่างอยู่ทางด้านขั้วลบ
7. หยอดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมกับ loading dye ลงในช่อง (well) ของ agarose gel ที่เตรียมไว้
8. ปิดฝาอ่าง และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก เดินเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแรง 80 volt ปล่อยไว้ 1 – 2 ชั่วโมง หรือวัดระยะทางแถบสีแถบบนที่เคลื่อนที่ลงมาประมาณ 4 ซม. นำเจลที่ได้ไปย้อมสีดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide 5 μl / TBE buffer 100 ml นานประมาณ 15 นาที นำเจลที่ได้ไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีโดยใช้เครื่อง UV transilluminator

ภาคผนวก 7 แบบบันทึกการรวบรวมตัวอย่างข้าวป่า

1. ทรงกอ 1 = กอตั้ง
   5 = กอเอน
   9 = แผ่-นอน
2. สีของกาบใบ 1 = เขียว
   2 = เขียวเส้นม่วง
   3 = ม่วงอ่อน
   4 = ม่วง
3. สีของแผ่นใบ 1 = เขียว
   2 = ม่วงที่ปลาย
   3 = ม่วงที่ริม
   4 = ม่วงทั้งใบ
4. สีของลิ้นใบ 1 = ไม่มีสี
   2 = ม่วง
5. สีปล้อง 1 = เขียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2 = เขียวเส้นม่วง

3 = ม่วง

6. สีข้อ 1 = เขียว

2 = ม่วง

7. รูปร่างของลิ้นใบ 1 = มี 1 ยอด

2 = มีสองยอด

8. สีของหูใบ 1 = ไม่มีสี

2 = ม่วง

9. สีของเมล็ด 1 = ฟาง

2 = น้ำตาล

3 = เหลือง

4 = แดง

5 = ดำ

10. สีของยอดเมล็ด 1 = ไม่มีสี

3 = แดง

11. ความยาวเกสรตัวผู้ 1 = 1/4 ของเมล็ด

2 = 1/2 ของเมล็ด

3 = 3/4 ของเมล็ด

4 = เต็มเมล็ด

12. สีของเกสรตัวเมีย 1 = ไม่มีสี

2 = แดง

3 = ม่วงดำ

13. หาง 1 = ไม่มี

2 = มี

14. สีของหาง 1 = ไม่มีสี

2 = สีเหลือง

3 = สีแดง

4 = สีดำ

15. สีของเยื่อหุ้มเมล็ด 1 = ขาว

2 = แดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3 = น้ำตาล

4 = ดำ

16. การร่วงของเมล็ด 1 = เมล็ดร่วง

2 = เมล็ดไม่ร่วง

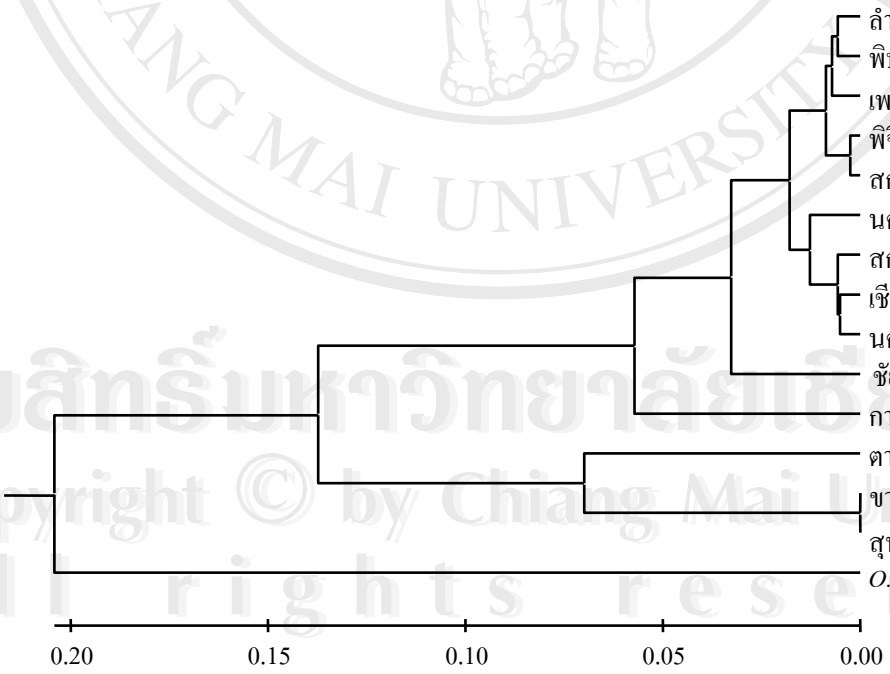
17. จำนวนครั้งการออกดอก 1 = 1 ครั้ง

2 = 2 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 8 ค่าความหลากหลายของประชากรข้าวสามัญ 12 ประชากรโดยวัดในตำแหน่ง RM1

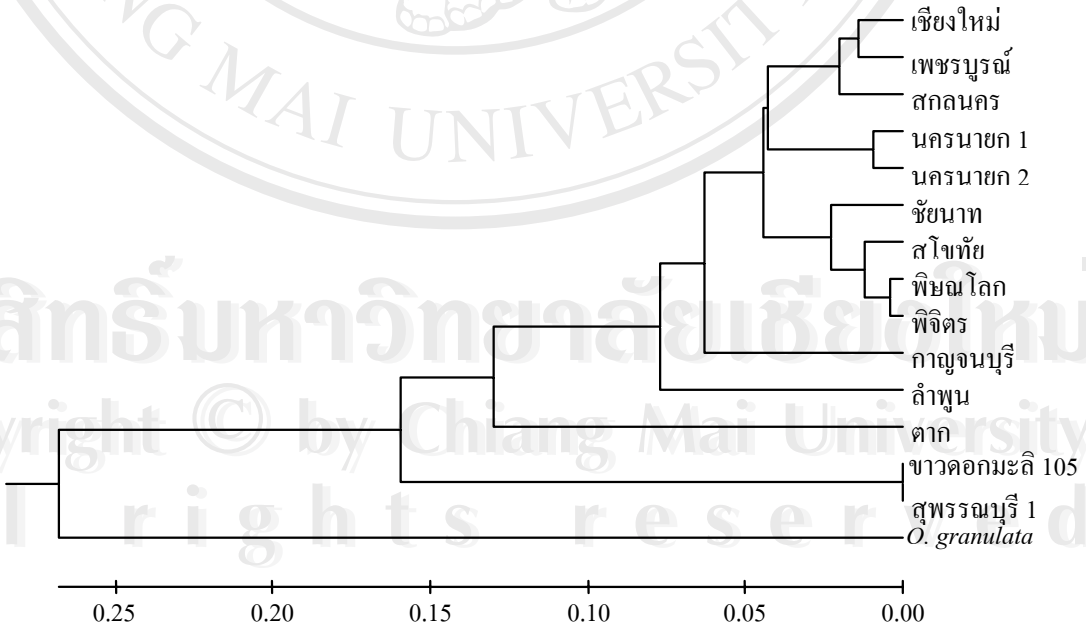
ประชากร	h	I	%P	Ht	Hs	G_{ST}
1. เชียงใหม่	0.087	0.141	38.46			
2. ลำพูน	0.115	0.182	38.46			
3. ตาก	0.106	0.163	38.46			
4. พิษณุโลก	0.106	0.167	38.46			
5. สุโขทัย	0.101	0.159	38.46			
6. พิจิตร	0.074	0.104	15.38			
7. เพชรบูรณ์	0.066	0.119	38.46			
8. ชัยนาท	0.111	0.163	30.77			
9. นครนายก 1	0.140	0.243	76.92			
10. นครนายก 2	0.162	0.245	46.15			
11. กาญจนบุรี	0.043	0.066	15.38			
12. สกลนคร	0.114	0.182	46.15			
รวม	0.166	0.288	92.31	0.166	0.102	0.386



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 9 ค่าความหลากหลาย และความสัมพันธ์ของประชากรข้าวป่าสามัญ 12 ประชากร โดยวัดในตำแหน่ง RM22

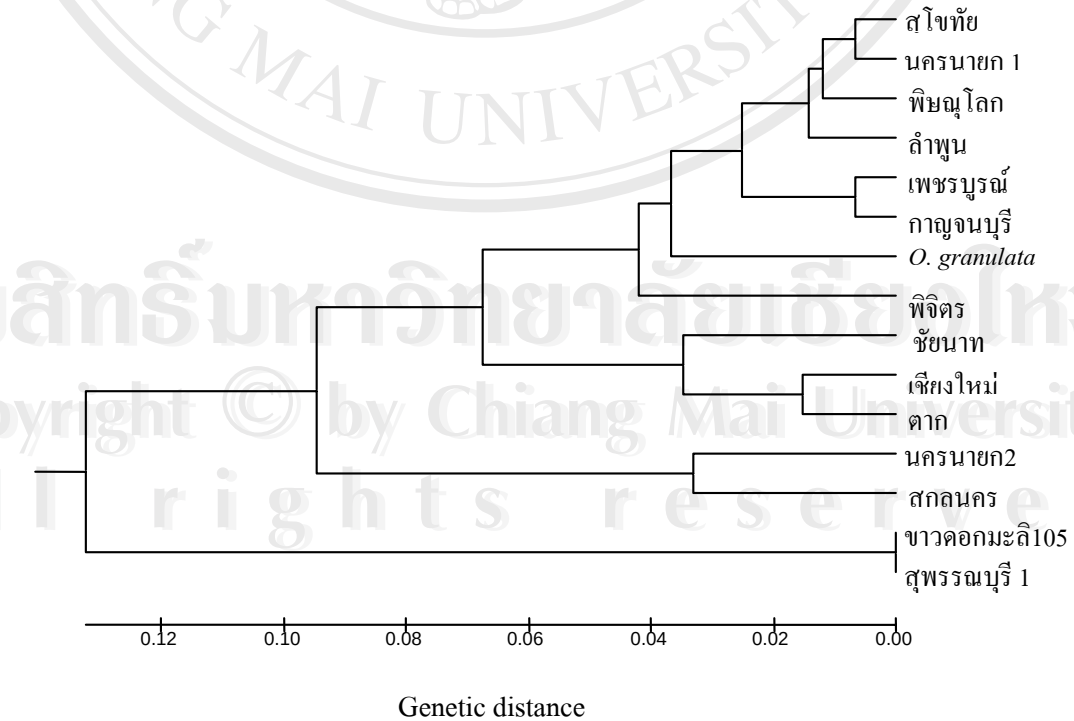
ประชากร	h	I	%P	Ht	Hs	G_{ST}
1. เชียงใหม่	0.185	0.290	64.29			
2. ลำพูน	0.150	0.224	42.86			
3. ตาก	0.090	0.130	21.42			
4. พิษณุโลก	0.172	0.286	78.57			
5. สุโขทัย	0.193	0.291	57.14			
6. พิจิตร	0.185	0.299	71.43			
7. เพชรบูรณ์	0.106	0.147	21.43			
8. ชัยนาท	0.226	0.341	64.29			
9. นครนายก 1	0.134	0.216	57.14			
10. นครนายก 2	0.180	0.281	64.29			
11. กาญจนบุรี	0.114	0.177	42.86			
12. สกลนคร	0.164	0.251	50			
รวม	0.247	0.401	92.86	0.248	0.160	0.361



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 10 ค่าความหลากหลาย และความสัมพันธ์ของประชากรข้าวป่าสามัญ 12 ประชากร โดยวัดในตำแหน่ง RM55

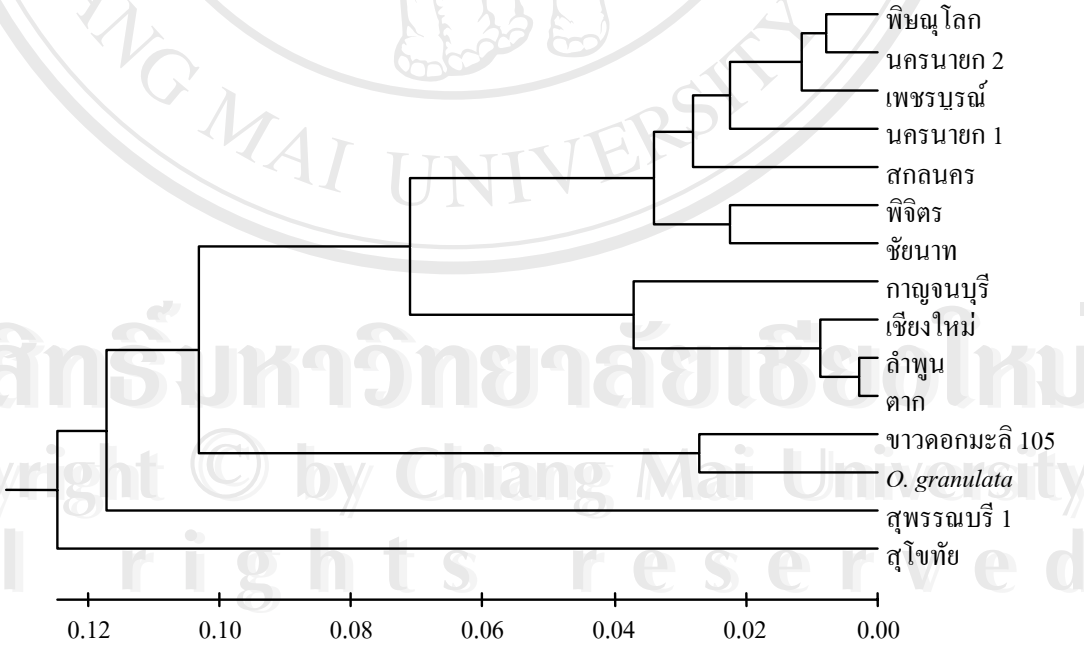
ประชากร	h	I	%P	Ht	Hs	G_{ST}
1. เชียงใหม่	0.122	0.182	33.33			
2. ลำพูน	0.196	0.293	58.33			
3. ตาก	0	0	0			
4. พิษณุโลก	0.179	0.275	58.33			
5. สุโขทัย	0.235	0.359	75.00			
6. พิจิตร	0.142	0.220	50.00			
7. เพชรบูรณ์	0.056	0.107	41.67			
8. ชัยนาท	0.174	0.264	58.33			
9. นครนายก 1	0.258	0.403	91.67			
10. นครนายก 2	0.160	0.243	50.00			
11. กาญจนบุรี	0.143	0.240	66.67			
12. สกลนคร	0.230	0.348	66.67			
รวม	0.247	0.390	100	0.247	0.158	0.360



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 11 ค่าความหลากหลาย และความสัมพันธ์ของประชากรข้าวป่าสามัญ 12 ประชากร วัดในตำแหน่ง RM164

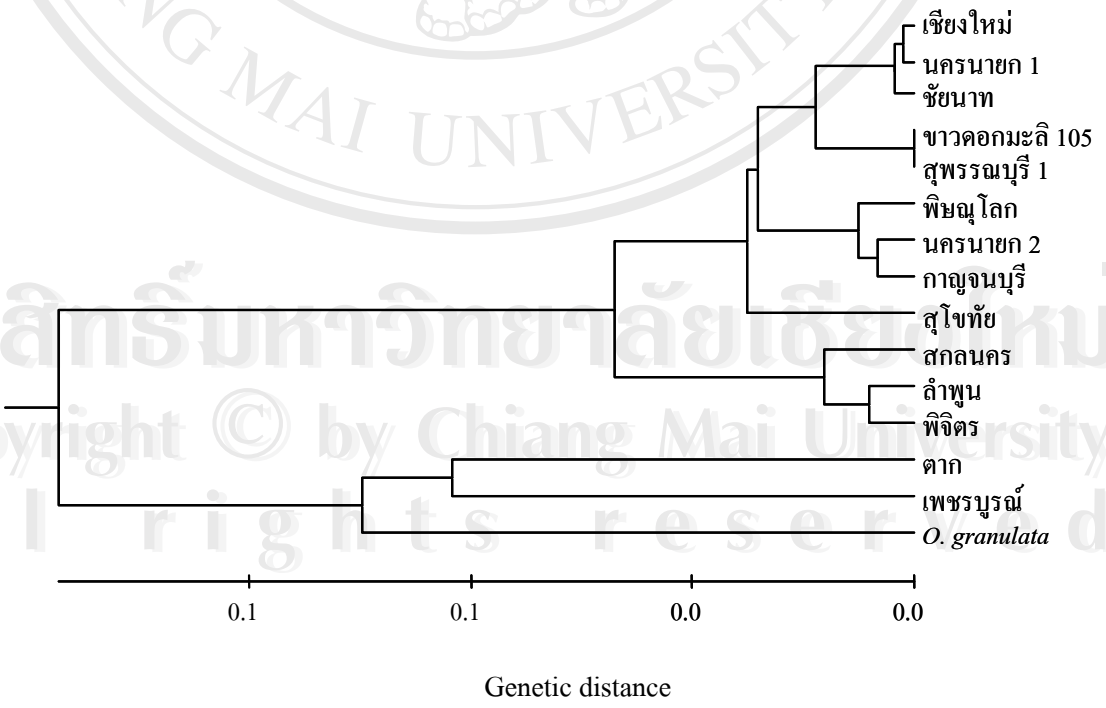
ประชากร	h	I	%P	Ht	Hs	G_{ST}
1. เชียงใหม่	0.072	0.107	21.05			
2. ลำพูน	0.033	0.054	15.79			
3. ตาก	0	0	0			
4. พิษณุโลก	0.145	0.243	68.42			
5. สุโขทัย	0	0	0			
6. พิจิตร	0.074	0.130	36.48			
7. เพชรบูรณ์	0.088	0.139	31.58			
8. ชัยนาท	0.152	0.241	57.89			
9. นครนายก 1	0.112	0.178	47.37			
10. นครนายก 2	0.126	0.211	57.89			
11. กาญจนบุรี	0.102	0.154	31.58			
12. สกลนคร	0.191	0.284	52.63			
รวม	0.188	0.312	94.74	0.188	0.092	0.512



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 12 ค่าความหลากหลาย และความสัมพันธ์ของประชากรข้าวป่า 12 ประชากร โดยวัดในตำแหน่ง RM211

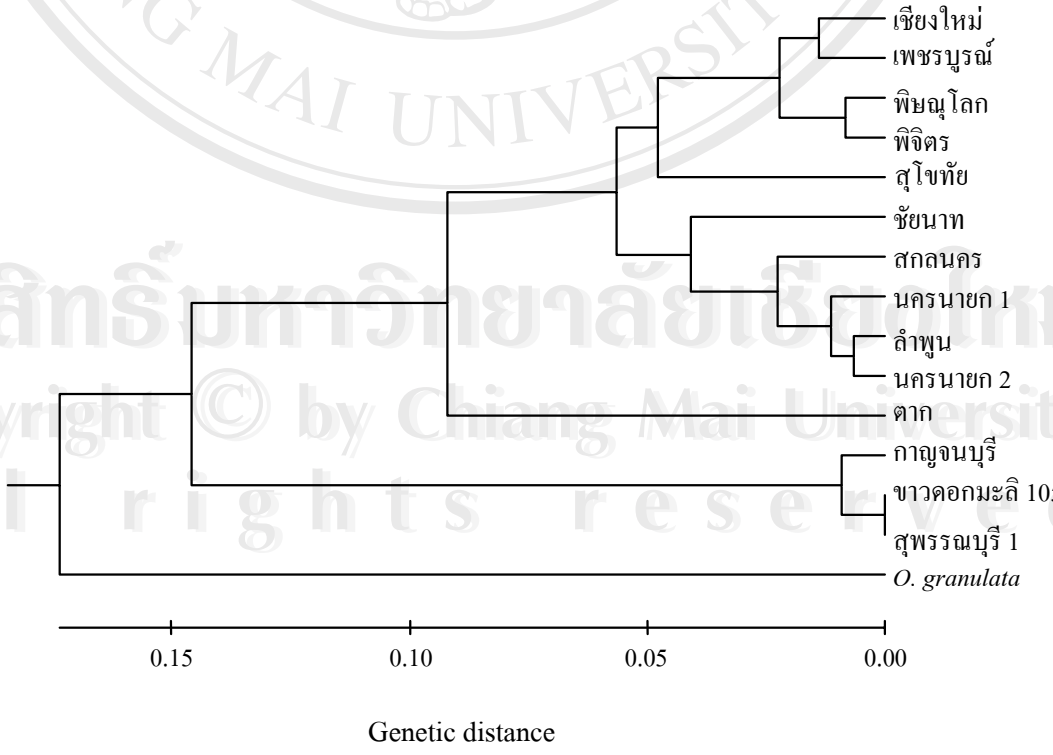
ประชากร	h	I	%P	Ht	Hs	G_{ST}
1. เชียงใหม่	0.099	0.138	20			
2. ลำพูน	0	0	0			
3. ตาก	0	0	0			
4. พิษณุโลก	0.202	0.308	60			
5. สุโขทัย	0.246	0.356	60			
6. พิจิตร	0.131	0.200	40			
7. เพชรบูรณ์	0.146	0.214	40			
8. ชัยนาท	0.107	0.205	30			
9. นครนายก 1	0.137	0.205	40			
10. นครนายก 2	0.185	0.286	60			
11. กาญจนบุรี	0.244	0.366	70			
12. สกลนคร	0.081	0.119	20			
รวม	0.262	0.400	90	0.262	0.131	0.498



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 13 ค่าความหลากหลายและความสัมพันธ์ของประชากรข้าวป่า 12 ประชากร วัดในตำแหน่ง RM212

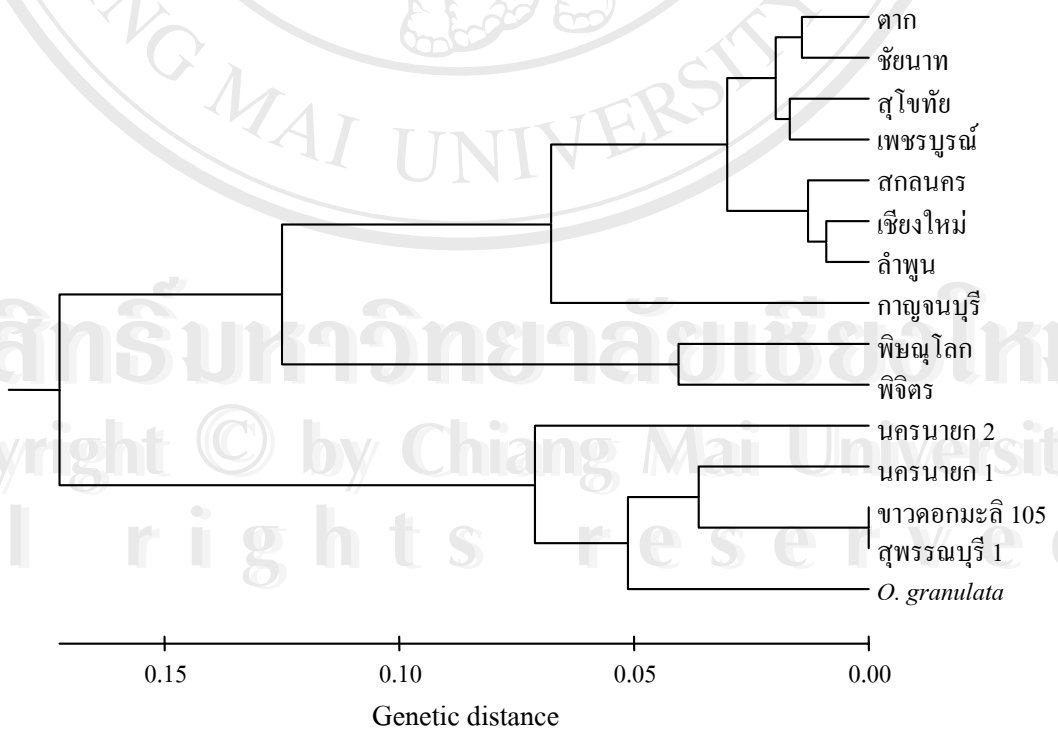
ประชากร	h	I	%P	Ht	Hs	G_{ST}
1. เชียงใหม่	0.136	0.214	45.45			
2. ลำพูน	0.207	0.323	72.73			
3. ตาก	0.240	0.362	72.73			
4. พิษณุโลก	0.131	0.220	63.64			
5. สุโขทัย	0.210	0.341	90.91			
6. พิจิตร	0.139	0.229	63.64			
7. เพชรบูรณ์	0.202	0.312	63.64			
8. ชัยนาท	0.035	0.067	27.27			
9. นครนายก 1	0.175	0.265	54.55			
10. นครนายก 2	0.164	0.272	73.73			
11. กาญจนบุรี	0.096	0.150	36.36			
12. สกลนคร	0.080	0.115	18.18			
รวม	0.244	0.398	100	0.244	0.151	0.379



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก 14 ค่าความหลากหลาก และความสัมพันธ์ของประชากรข้าวป่า 12 ประชากร โดยวัดในตำแหน่ง RM253

ประชากร	h	I	%P	Ht	Hs	G_{ST}
1. เชียงใหม่	0.175	0.262	50			
2. ลำพูน	0.156	0.234	42.86			
3. ตาก	0.167	0.258	57.14			
4. พิษณุโลก	0	0	0			
5. สุโขทัย	0.219	0.337	71.43			
6. พิจิตร	0.045	0.073	21.43			
7. เพชรบูรณ์	0.054	0.094	28.57			
8. ชัยนาท	0.172	0.270	64.29			
9. นครนายก 1	0.172	0.256	50			
10. นครนายก 2	0.064	0.101	21.43			
11. กาญจนบุรี	0.107	0.163	35.71			
12. สกลนคร	0.195	0.299	64.29			
รวม	0.252	0.395	92.86	0.252	0.127	0.495



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายอดิเรก ปัญญาลือ
วัน เดือน ปีเกิด	7 ตุลาคม 2523
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนนวมินทราชูทิศ พายัพ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2541 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2545
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นระยะเวลา 2 ปีตั้งแต่วันที่ 15 เดือนพฤษภาคม 2548 ถึงวันที่ 15 พฤษภาคม 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved