บทที่ 3
วิธีการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในกลุ่มประชากรตัวอย่างเพื่อการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีเมล็ดต่อรวงมาก ใช้ข้าวพันธุ์รับ กข 6 ซึ่งมีเมล็ดต่อรวงเท่ากับ 207 เมล็ด และพันธุ์ชัยนาท 1 มีเมล็ดต่อรวง 133 เมล็ด เพื่อสร้างประชากรตัวอย่างในการศึกษา โดยทำการคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้จากข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์พื้นเมืองต่างๆ ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก (วราภรณ์, 2551) รวมถึงค้นคว้าข้อมูลของยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยีนที่เคยมีรายงาน ได้แก่ ยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แล้วสืบค้นตำแหน่งของยีนดังกล่าวจากฐานข้อมูลข้าวเพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับตำแหน่งของยีนดังกล่าว ซึ่งเป็น target linked marker แล้วนำมาทดสอบหาความแตกต่างของลำดับเบสในบริเวณยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ เพื่อใช้คัดเลือกต้นข้าวที่ได้รับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยีนจากพันธุ์ให้ในการสร้างประชากรตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรดังกล่าว ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของแต่ละยีนที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี single regression และ multiple-locus regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุด เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีเมล็ดต่อรวงมากได้ต่อไป

การศึกษานี้ทำการทดลองทั้งหมด 6 การทดลอง คือ

1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ (donor parent) ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก เพื่อใช้สร้างกลุ่มประชากรตัวอย่างสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรตัวอย่างที่สร้างขึ้น

2. การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

3. การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง และคัดเลือกเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 และชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้พันธุ์แปดริ้ว และเมืองไทร

4. สร้างประชากรตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ได้แก่ ประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว ประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร

5. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์แปดริ้ว

6. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์เมืองไทร

อุปกรณ์ และสารเคมีในการวิจัย

1. ขั้นตอนการปลูกข้าว และผสมพันธุ์ข้าว
   - 1.1 กระถางไม่มีรูขนาด 12 นิ้ว
   - 1.2 ดิน
   - 1.3 จอบ
   - 1.4 ไม้ปักป้าย
   - 1.5 ซองน้ำตาลสำหรับใส่เมล็ด
   - 1.6 ขวดเพาะเมล็ด
   - 1.7 เครื่องเขย่า (shaker)
   - 1.8 กระดาษทิชชู
   - 1.9 กระติกน้ำร้อน
   - 1.10 ถุงผสม
   - 1.11 คลิปหนีบกระดาษ
   - 1.12 ปากคีบ

1.13 กรรไกรตัดแต่งเมล็ด

1.14 กล่องพลาสติก

1.15 กาต้มน้ำร้อน

1.16 ป้าย (Tag) และเชือกผูกป้าย

1.17 ดินสอ ยางลบ สมุดบันทึก

1.18 แอลกอฮอล์

1.19 ตู้เก็บเมล็ดพันธุ์

1.20 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

1.21 ตู้ปลอดเชื้อ

1.22 ถุงพลาสติก

1.23 ตู้อบ

1.24 คลอรีนน้ำ 10%

1.25 น้ำกลั่น

1.26 ปุ๋ยคอก

1.27 ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15

1.28 เครื่องพ่นสารเคมี

1.29 ห้องมืดควบคุมความยาวของช่วงแสง

2. ขั้นตอนการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล

2.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป genomic DNA purification kit ของบริษัท Fermentas

2.2 ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)

2.4 อ่างน้ำร้อน (water bath)

2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)

2.6 เครื่องชั่ง (balance) 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

2.7 ที่วางหลอดตัวอย่าง (rack)

2.8 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น PCT-100

2.9 เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า หรือเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis units)

2.10 เครื่องสำรองไฟ (power supply)

2.11 น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.12 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)

2.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge)

2.14 เครื่องไมโครเวฟ

2.15 ถุงมือยาง

2.16 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

2.17 ลูกปืนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร

2.18 ขวดดูแรน ขนาด 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร

2.19 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร

2.20 เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (hotplate stirrer)

2.21 เครื่องเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดเล็ก (mini centrifuge)

2.22 ตัวดูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 0.2-2 ไมโครลิตร (pipettes P2)

2.23 ตัวดูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 2-20 ไมโครลิตร (pipettes P20)

2.24 ตัวดูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 20-200 ไมโครลิตร (pipettes P200)

2.25 ตัวดูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 200-1,000 ไมโครลิตร (pipettes P1000)

2.26 ทิปสำหรับดูดจ่ายสาร (tip)

2.27 หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (centrifuge tube)

2.28 2x Promega's PCR green master mix

2.29 ทริส เบส (tris base)

2.30 Ethylenediaminetetra-acetic acid di-sodium salt (EDTA)

2.31 กรดบอริก (boric acid)

2.32 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

2.33 ผงวุ้นอะกาโรส (agarose)

2.34 หลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube)

2.35 เครื่อง Gel Doc 2000 (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

2.36 ซอฟท์แวร์ Quantity One (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

2.37 กระติกน้ำแข็ง

2.38 ดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 50 และ100 เบส

3. พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับ ได้แก่

3.1 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีจำนวนเมล็ดต่อรวงประมาณ 207 เมล็ด

3.2 ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 มีจำนวนเมล็ดต่อรวงประมาณ 133 เมล็ด

พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ ได้แก่

3.3 ข้าวเจ้าพันธุ์เมืองไทร มีจำนวนเมล็ดต่อรวงประมาณ 338 เมล็ด

3.4 ข้าวเจ้าพันธุ์แปดริ้ว มีจำนวนเมล็ดต่อรวงประมาณ 266 เมล็ด

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ (donor parent) ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก เพื่อใช้สร้างกลุ่มประชากรตัวอย่างสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรตัวอย่างที่สร้างขึ้น

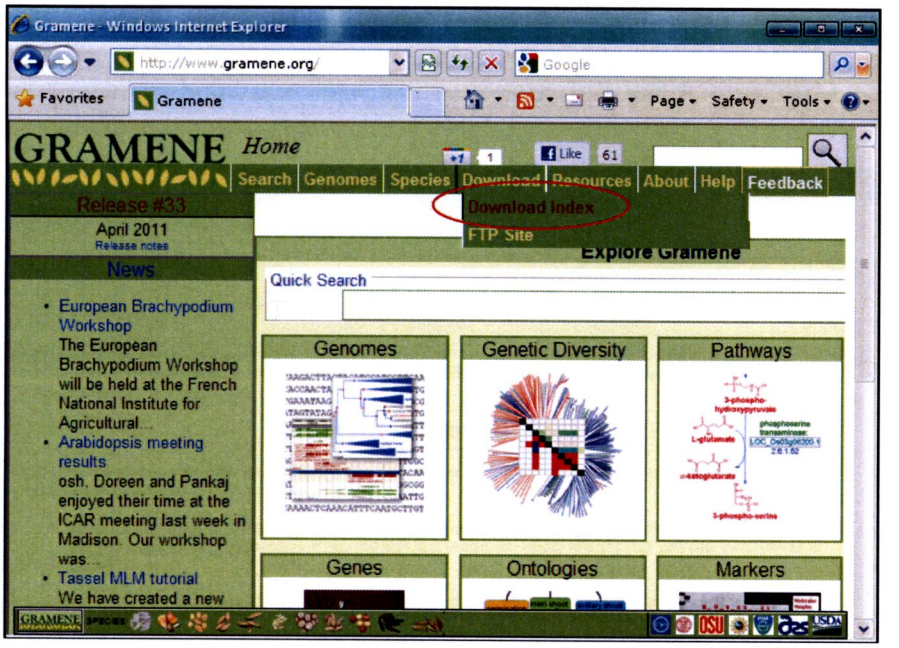
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในกลุ่มประชากรตัวอย่าง เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีเมล็ดต่อรวงมาก จึงจำเป็นต้องคัดเลือกข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้เพื่อสร้างประชากรตัวอย่างสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าว คัดเลือกข้าวพันธุ์รับ ได้แก่ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเท่ากับ 207 เมล็ด และข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 มีจำนวนเมล็ดต่อรวง 133 เมล็ด เนื่องจากเป็นข้าวที่เกษตรกรนิยมปลูก และคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ (donor parent) ที่มีลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก เพื่อให้ยีนควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก จากรายงานพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก (วราภรณ์, 2551) ซึ่งได้รวบรวม และศึกษาข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก และข้าวพันธุ์ต่างๆ ทั้งหมด 43 พันธุ์ พบว่าพันธุ์ข้าวที่สามารถใช้เป็นพันธุ์ให้ได้ ได้แก่ พันธุ์เมืองไทร พันธุ์แปดริ้ว และพันธุ์เม็ดมะเขือ ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ยสูงถึง 338 266 และ 264 เมล็ด ตามลำดับ แล้วทำการคัดเลือกเพื่อสร้างคู่ผสมกับข้าวพันธุ์รับทั้งสองพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 กับข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 โดยพิจารณาจากข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อรวง ประกอบกับลักษณะความสูง และอายุวันออกดอก

การทดลองที่ 2 การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

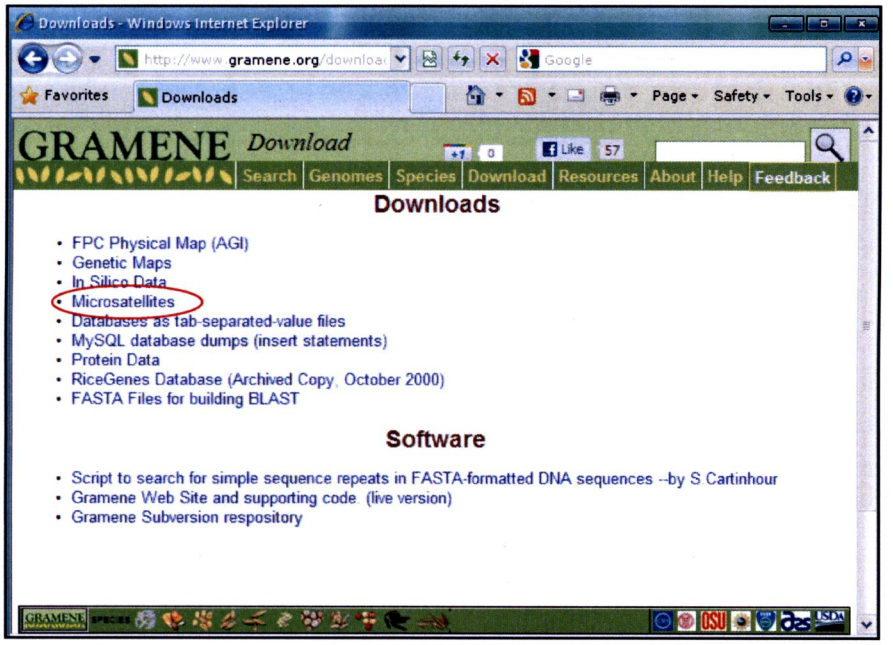
ในการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ซึ่งควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงนั้น สามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูลข้าวในเว็บไซต์ Gramene (http://www.gramene.org/markers/microsat/) ซึ่งได้รวบรวมเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ตำแหน่งต่างๆ บนโครโมโซมของข้าวในตาราง supplementary table 18 ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จาก IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project [IRGSP], 2005) สามารถดาวน์โหลดตาราง supplementary table 18 จากเว็บไซต์ ได้ดังนี้

1.1 เข้าเว็บไซต์ Gramene ที่ http://www.gramene.org/

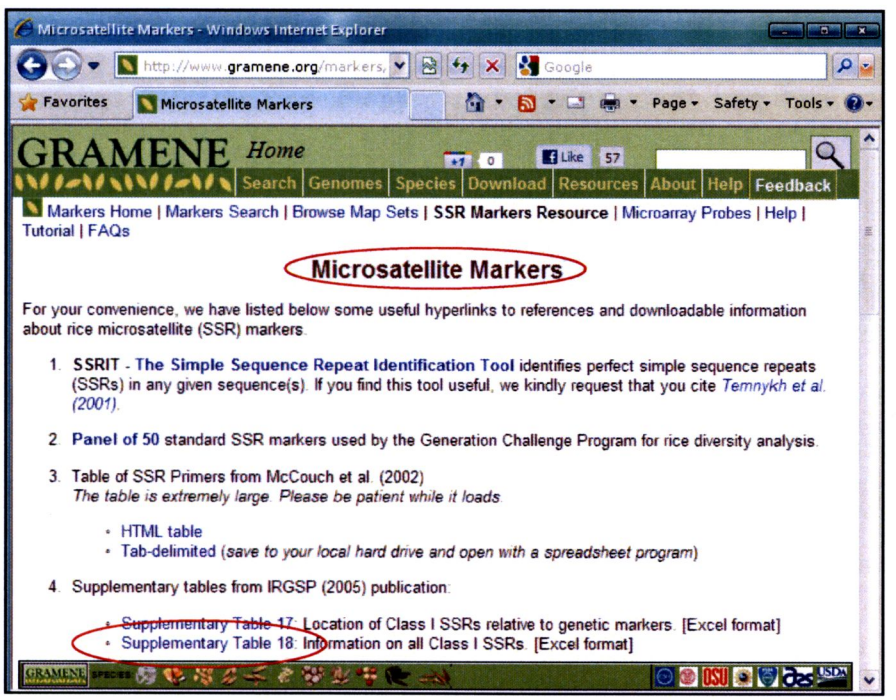
1.2 เลือกแถบ download จากนั้นเลือก download index

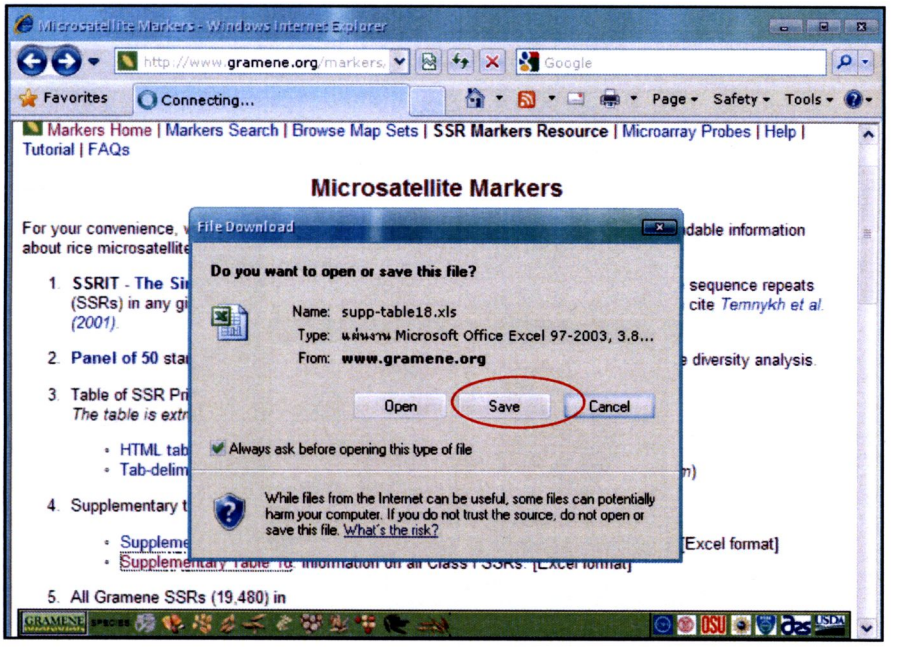


1.3 หน้าต่างจะปรากฏหัวข้อ downloads เลือก microsatellites



1.4 เมื่อหน้าต่างปรากฏ microsatellite markers จากนั้นเลือก supplementary table 18 ซึ่งจะแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ และรายละเอียดต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR เมื่อเลือกแล้วจะปรากฏหน้าต่าง file download จากนั้นกด save เพื่อบันทึกตารางดังกล่าว





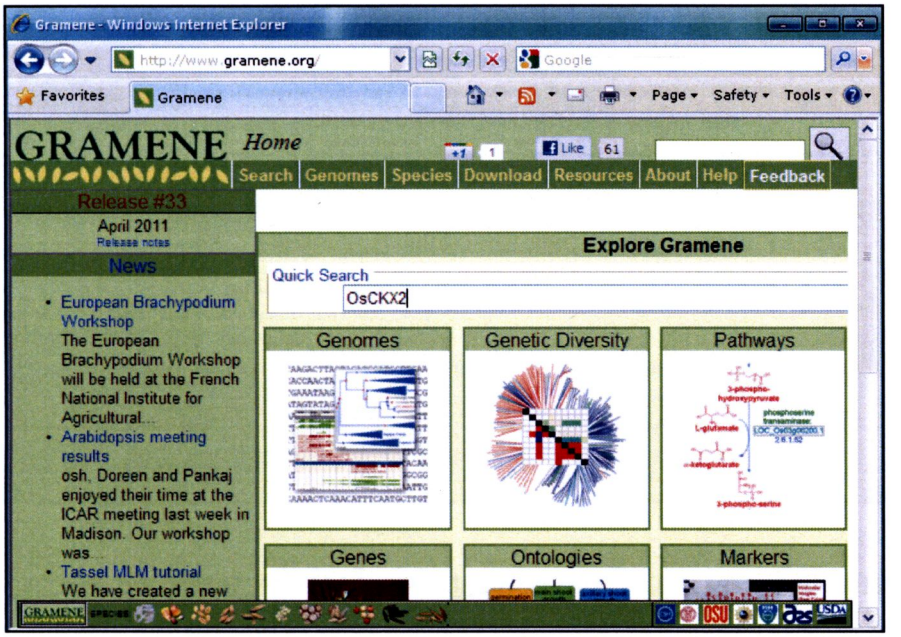
1.5 จากนั้นจึงทำการหา และคัดเลือกเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้ง 4 ยีน ได้แก่ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* โดยคัดเลือกเครื่องหมายที่มีระยะจากทั้งสองข้างของยีนได้ถึง 95,000 เบส

การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้ง 4 ยีน ได้แก่ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* จากตาราง supplementary table 18 มีวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

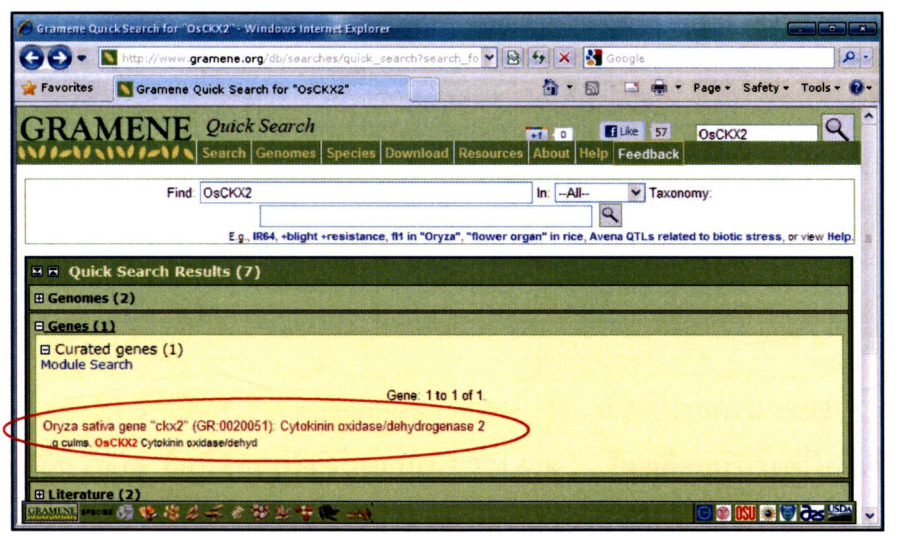
2.1 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*

การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* จากตาราง supplementary table 18 มีขั้นตอนดังนี้

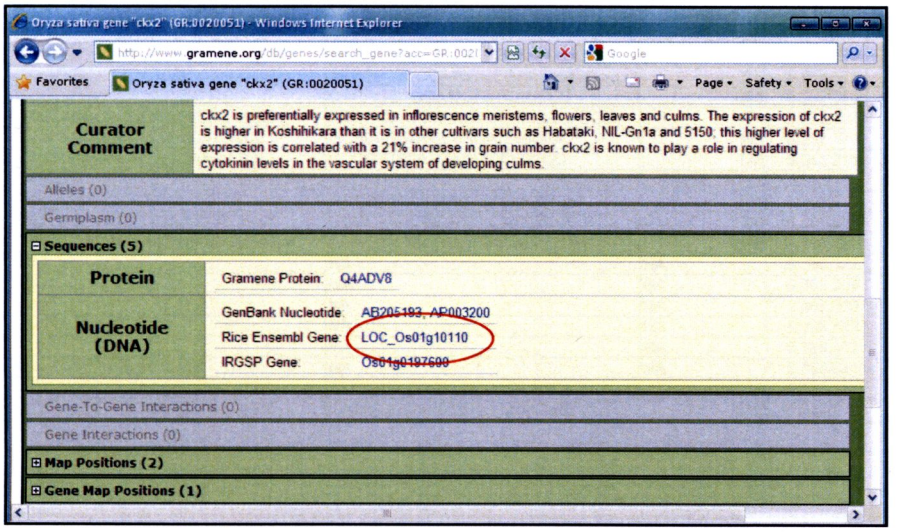
2.1.1 ค้นหาตำแหน่งของยีน *Gn1a* ซึ่งมีรายงานว่าเป็นยีนที่ผลิตฮอร์โมนไซโตไคนิน ออกซิเดส/ดีไฮโดรจีเนส (Cytokinin oxidase/dehydrogenase; CKX, OsCKX2) (Ashikari *et al.*, 2005) หาข้อมูลได้จากเว็บไซต์ Gramene โดยพิมพ์ OsCKX2 ในช่อง Quick Search แล้วกดค้นหา ดังภาพ



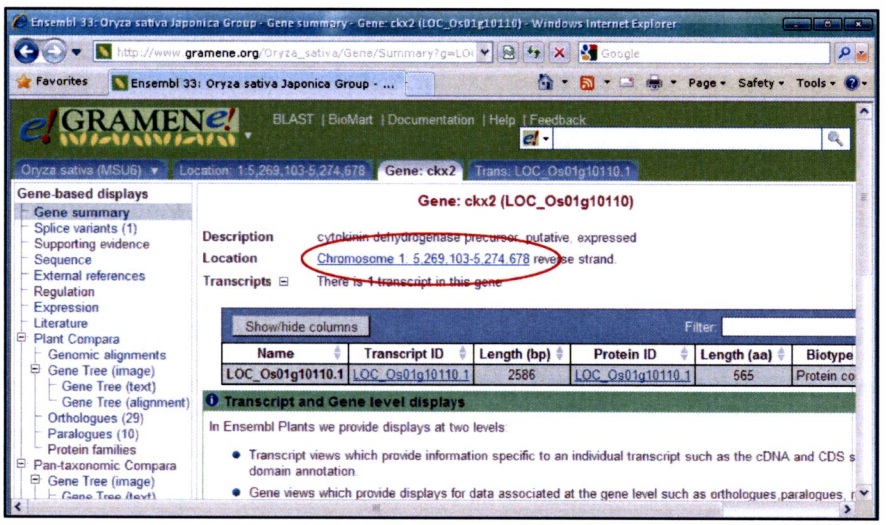
2.1.2 ผลการค้นหาปรากฏหน้าต่างซึ่งแสดงรายละเอียดของยีน *OsCKX2* หรือยีน *Gn1a* แล้วเลือก Gene (1) จากนั้นเลือก Oryza sativa gene "ckx2" (GR:0020051): Cytokinin oxidase/dehydrogenase 2



2.1.3 เลือก sequence (5) ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน และลำดับเบสของดีเอ็นเอ จากนั้นเลือก LOC_Os01g10110



2.1.4 ปรากฏหน้าต่างที่แสดงรายละเอียดของยีน *Gn1a* รวมถึงตำแหน่ง และลำดับเบสของยีน ซึ่งยีน *Gn1a* นั้นตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ตำแหน่งเบสที่ 5,269,103-5,274,678



2.1.5 เปิดตาราง supplementary table 18 ด้วยโปรแกรม excel แล้วหาตำแหน่งเบสของยีน *Gn1a* คือที่ตำแหน่ง 5,269,103-5,274,678 โดยเลือกบริเวณที่ใกล้เคียงมากที่สุด ซึ่งจากตารางยีน *Gn1a* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM10315 (เบสตำแหน่งที่ 5,243,215-5,243,274) และ RM10316 (เบสตำแหน่งที่ 5,286,497-5,286,516) จากนั้นแทรกแถวระหว่าง RM10315 และ RM10316 ทำแถบสีในบริเวณดังกล่าว สำหรับการอ้างอิงในการหา target linked marker

McCouch Locus_ID	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end
RM10310	TGCAGTAATATGCTGTGCTGATCG	AAGCTAGCTCGATTGGTCGAACG	86	5,200,997	5,201,016
RM10311	TGGCGTAGTTCATGGCGTAGTGG	ACCATCTCCCATGTCGAAGTACGG	275	5,215,576	5,215,596
RM10312	TGGCATACGCGTGGTAGTCC	CAGAGGTGGAGGTGTCAGTCG	366	5,232,170	5,232,189
RM3360	ACTTACACAAGGCCGGGAAAGG	TGGTAGTGGTAACTCTACTCCGATGG	171	5,236,487	5,236,516
RM10314	CATGCATACTTTGTGCCTTGTCC	GCACGTGCTCCTACATTGATGC	169	5,241,778	5,241,797
RM10315	CAAGTTGCACACACCAAGATGC	CCCTCCTGATCATATCCCTTGC	171	5,243,215	5,243,274
	Gn1a			**5,269,103**	**5,274,678**
RM10316	AAGATCGCTGGGAGATCTGTAGG	GCATGCTAATTAGTCAGCCTTGG	149	5,286,497	5,286,516
RM10318	TGTCTCACACATTGCACACTTACC	GGCCTAACCCAACACATGTCC	188	5,359,033	5,359,052
RM10319	TCTAACACAGAACTCCCGAAGATCC	CGATCAGGAGCGTTACATATTTGG	383	5,363,131	5,363,152
RM10320	NA	NA	NA	5,366,122	5,366,191
RM10321	NA	NA	NA	5,366,333	5,366,356
RM10322	NA	NA	NA	5,366,399	5,366,436
RM10323	NA	NA	NA	5,366,483	5,366,502
RM10324	NA	NA	NA	5,366,503	5,366,524
RM10325	NA	NA	NA	5,366,541	5,366,560
RM10326	AGCCGGGCATACAGTCTTTCTCC	TCATGGCGTGTTGGCACTAGC	278	5,368,282	5,368,307
RM10327	ACTTCTGTTGTCCCACTGACAGG	GAGAGGTCGTCGAGGAACAGC	329	5,442,070	5,442,090

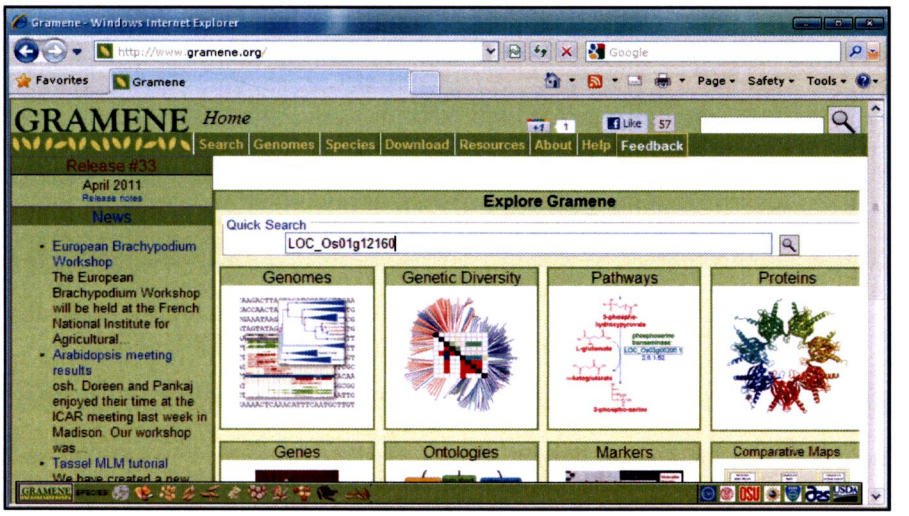
2.1.6 เปรียบเทียบจำนวนเบสของเครื่องหมายโมเลกุล SSR แต่ละตัวที่อยู่ใกล้กับยีน *Gn1a* เพื่อหา target linked marker ซึ่งมีระยะจากทั้งสองข้างของยีน *Gn1a* ได้ถึง 95,000 เบส แล้วทำสัญลักษณ์ด้วยแถบสี

2.1.7 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker โดยคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงไว้ในตาราง แล้วสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมดจากบริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด

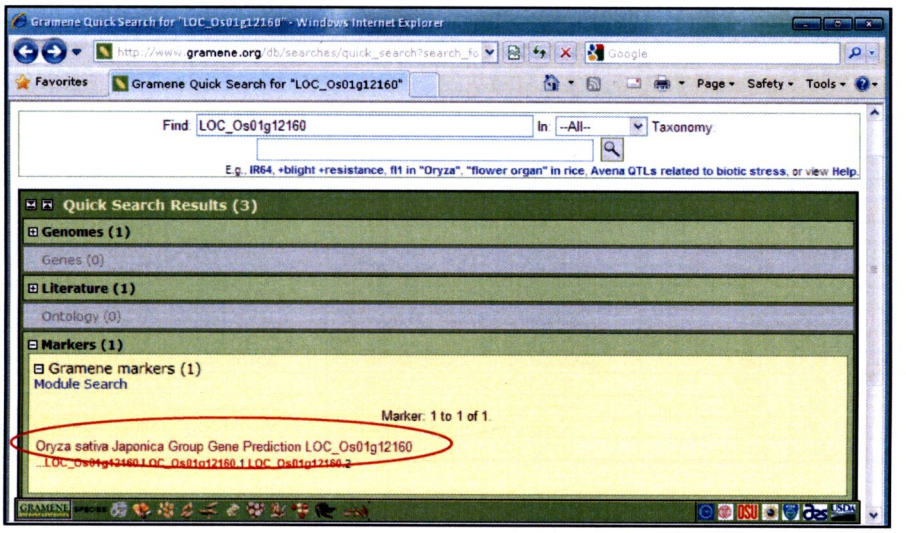
2.2 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1*

การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* จากตาราง supplementary table 18 มีขั้นตอนดังนี้

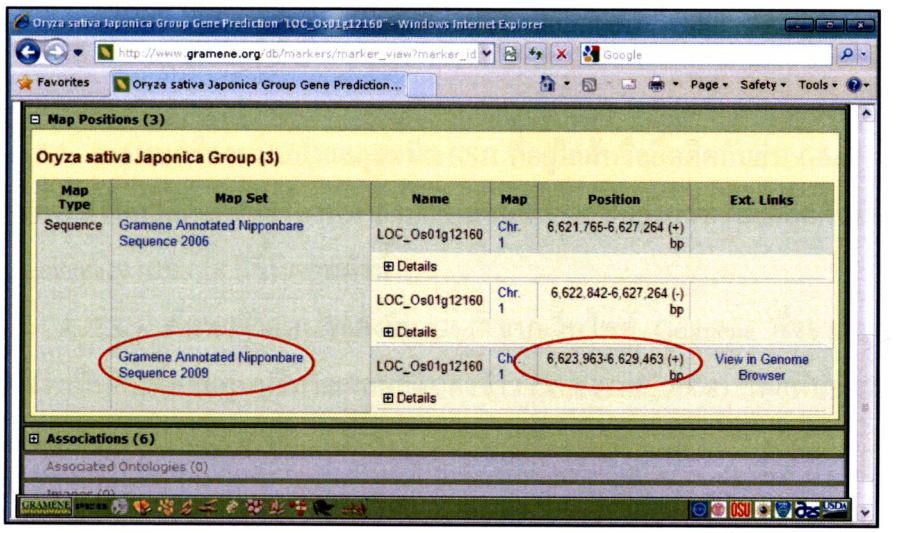
2.2.1 ค้นหาตำแหน่งของยีน *SPP1* ซึ่งจากการตรวจเอกสารพบว่าบริเวณ LOC_Os01g12160 คือ ยีน *SPP1* (Liu *et al.*, 2009) แล้วทำการหาข้อมูลตำแหน่งของยีนจากเว็บไซต์ Gramene โดยพิมพ์ LOC_Os01g12160 ในช่อง Quick Search แล้วกดค้นหา ดังภาพ



2.2.2 ผลการค้นหาปรากฏหน้าต่างซึ่งแสดงรายละเอียดของบริเวณที่เป็นยีน *SPP1* คือ LOC_Os01g12160 แล้วเลือก Marker (1) จากนั้นเลือก Oryza sativa Japonica Group Gene Prediction LOC_Os01g12160



2.2.3 เลือก Map Position (3) เพื่อดูรายละเอียดของตำแหน่งของยีน โดยเลือกจากข้อมูลใหม่ล่าสุด คือ ปี ค.ศ. 2009 ซึ่งได้แสดงตำแหน่งของยีน *SPP1* บนโครโมโซมที่ 1 ตำแหน่งเบสที่ 6,623,963-6,629,463



2.2.4 เปิดตาราง supplementary table 18 ด้วยโปรแกรม excel แล้วหาตำแหน่งเบสของยีน *SPP1* คือที่ตำแหน่ง 6,623,963-6,629,463 โดยเลือกบริเวณที่ใกล้เคียงมากที่สุด ซึ่งจากตารางยีน *SPP1* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM10393 (เบสตำแหน่งที่ 6,600,019-

6,600,054) และ RM10394 (เบสตำแหน่งที่ 6,629,276-6,629,295) จากนั้นแทรกแถวระหว่าง RM10393 และ RM10394 ทำแถบสีในบริเวณดังกล่าว สำหรับการอ้างอิงในการหา target linked marker

McCouch Locus_ID	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end
RM10389	NA	NA	NA	6,576,020	6,576,040
RM10390	GCAACGTTACGTCTTGGCATGG	CCTCTCGCGTCTCTCTCAACG	90	6,580,847	6,580,868
RM10391	NA	NA	NA	6,593,661	6,593,686
RM10392	NA	NA	NA	6,593,687	6,593,710
RM10393	GGCAGAGAAGATCGAATATGATGG	TAGCTACGCGCGTTCTTCATAGC	285	6,600,019	6,600,054
	SPP1			**6,623,963**	**6,629,463**
RM10394	CAGCAGCAGCGAGATTAACAGC	GTCGTCTCTTGCTCTGTTCTTGG	176	6,629,276	6,629,295
RM10395	GCAAGATTCAGTTCAGGTTTGC	ATGTGCCCTTTCGTTGTACTCC	289	6,639,665	6,639,712
RM10396	TTTGCAGGTGGACAGGAAATGG	AATAGCAGCTTGCTTGGATGTGC	289	6,639,789	6,639,840
RM10397	ATGTCGAGCGGTGGTTGTATAGTTCG	ACCGTGATTTGGTTGTGTTTCAGC	320	6,646,567	6,646,604
RM10398	TCTCCTTGCTCTACTGCCTTTGG	TTCTGCAACTTGCCAAGAAGACC	137	6,672,572	6,672,613
RM10399	NA	NA	NA	6,673,738	6,673,779
RM10400	CTCTCTCCTGATGGTAAACTCTCC	ATATAGAGGTGCCTTGTGTGAAGG	482	6,673,948	6,673,997
RM10401	ACACACTCACACCCATCCATCC	TGATCTGCACACTGCAAACACC	277	6,676,165	6,676,190
RM10402	TGGATTGAAGGGAGCTCTACACC	TTGCTCCACACGATCTACACAGC	287	6,692,293	6,692,330
RM10403	CATATACATCACAGCCGCTTGTAGG	AGCGAGATGGAAGGCAAGAGC	407	6,703,333	6,703,354
RM10404	CTGGAGTGGTTTCTCTCCTCTGC	TACTCTGCTCGCGTAACTTCTCC	312	6,709,630	6,709,653

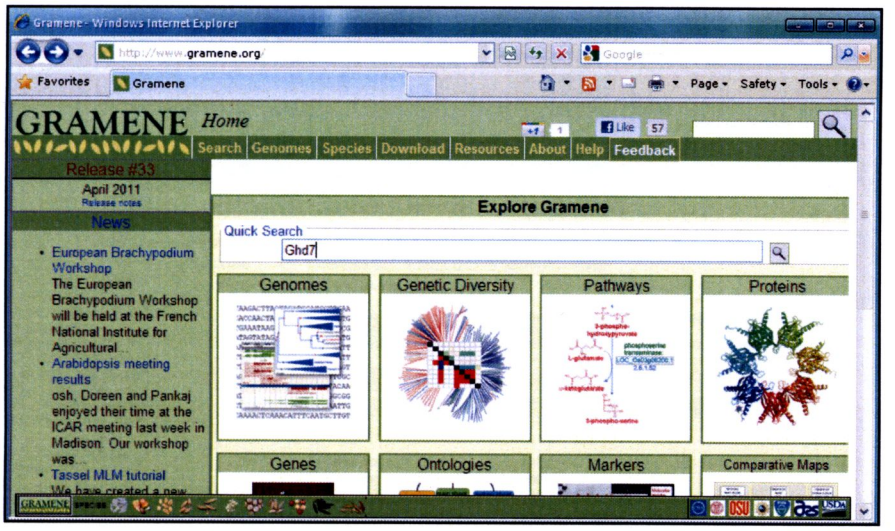
2.2.5 เปรียบเทียบจำนวนเบสของเครื่องหมายโมเลกุล SSR แต่ละตัวที่อยู่ใกล้กับยีน *SPP1* เพื่อหา target linked marker ซึ่งมีระยะจากทั้งสองข้างของยีน *SPP1* ได้ถึง 95,000 เบส แล้วทำสัญลักษณ์ด้วยแถบสี

2.2.6 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker โดยคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงไว้ในตาราง แล้วสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมดจากบริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด

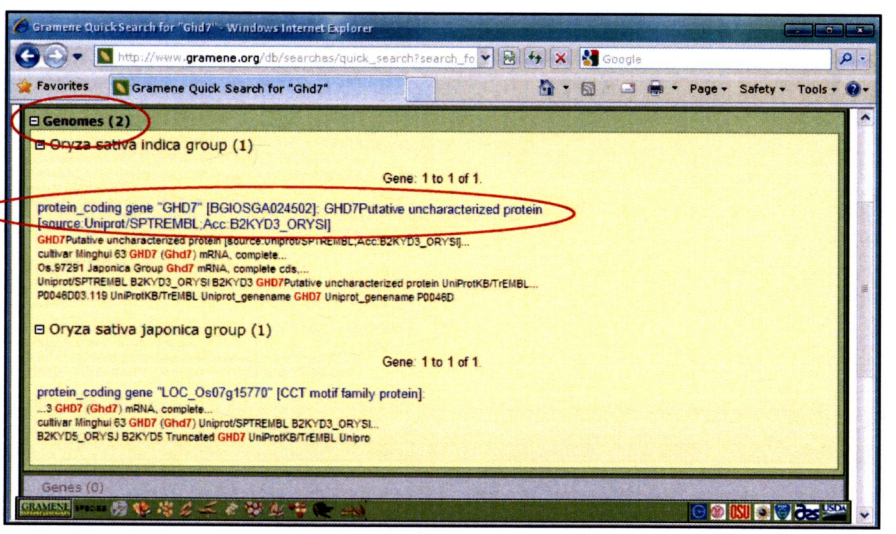
2.3 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7*

การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* จากตาราง supplementary table 18 มีขั้นตอนดังนี้

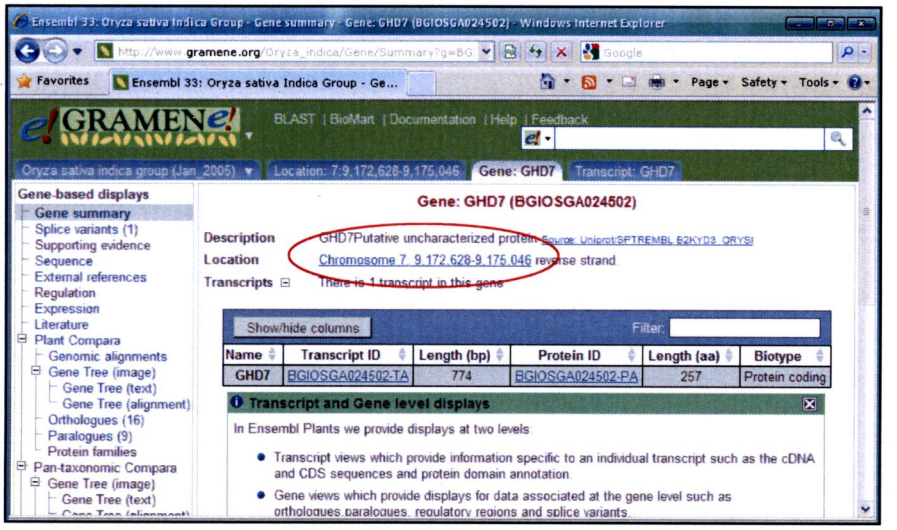
2.3.1 ค้นหาตำแหน่งของยีน *Ghd7* จากเว็บไซต์ Gramene ซึ่งจากการตรวจเอกสารมีรายงานว่าเป็นยีนที่ควบคุมปริมาณผลผลิตของข้าว (Xue *et al.*, 2008) โดยพิมพ์ *Ghd7* ในช่อง Quick Search แล้วกดค้นหา ดังภาพ



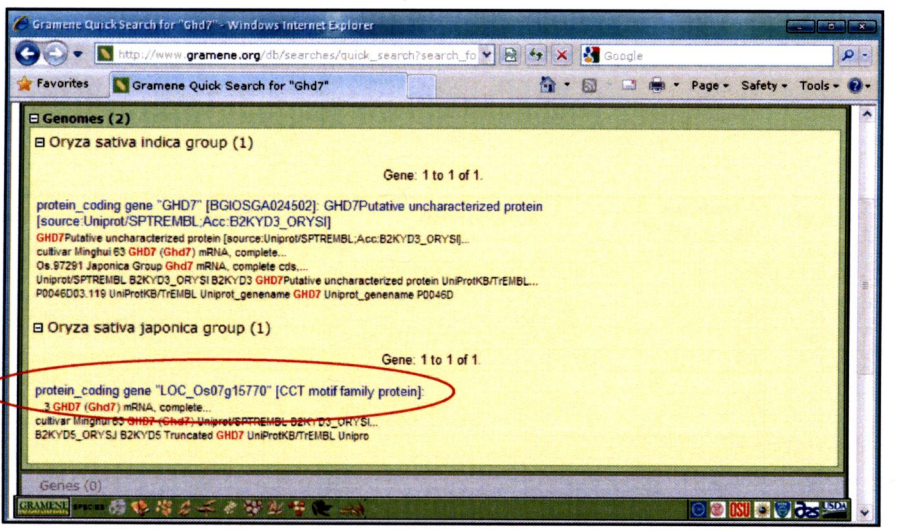
2.3.2 ผลการค้นหาปรากฏหน้าต่างซึ่งแสดงรายละเอียดของบริเวณที่เป็นยีน *Ghd7* แล้วเลือก Genome (2) ซึ่งยีน *Ghd7* นี้มีการศึกษาทั้งในข้าวอินดิกา และจาปอนิกา จากนั้นเลือก protein_coding gene "GHD7" [BGIOSGA024502]: GHD7Putative uncharacterized protein [source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:B2KYD3_ORYSI]



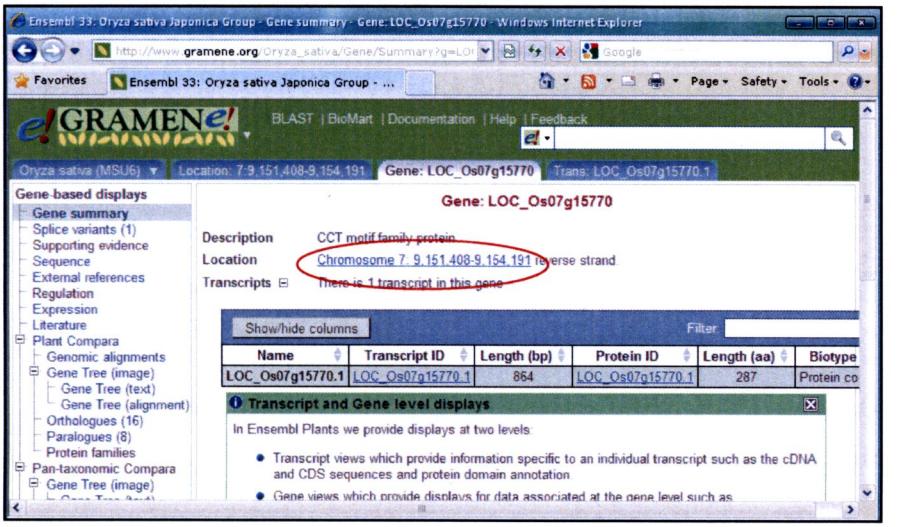
2.3.3 ปรากฏหน้าต่างที่แสดงรายละเอียดของยีน *Ghd7* ในข้าวอินดิกา ซึ่งแสดงตำแหน่ง และลำดับเบสของยีน โดยยีน *Ghd7* ในข้าวอินดิกานั้นตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 ตำแหน่งเบสที่ 9,172,628-9,175,046



2.3.4 จากนั้นย้อนกลับไปที่หน้าแสดงผลการค้นหา แล้วทำการเลือก protein_coding gene "LOC_Os07g15770" [CCT motif family protein]: เพื่อดูรายละเอียดของตำแหน่งของยีน *Ghd7* ในข้าวจาปอนิกา



2.3.5 ปรากฏหน้าต่างที่แสดงรายละเอียดของยีน *Ghd7* ในข้าวจาปอนิกา ซึ่งแสดงตำแหน่ง และลำดับเบสของยีน โดยยีน *Ghd7* ในข้าวจาปอนิกานั้นตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 ตำแหน่งเบสที่ 9,151,408-9,154,191



2.3.6 เปิดตาราง supplementary table 18 ด้วยโปรแกรม excel แล้วหาตำแหน่งของยีน *Ghd7* ที่ครอบคลุมบริเวณที่เป็นยีนทั้งในข้าวอินดิกา และจาปอนิกา คือ ในช่วงตำแหน่งเบสที่ 9,151,408-9,175,046 โดยเลือกบริเวณที่ใกล้เคียงมากที่สุด ซึ่งจากตารางยีน *Ghd7* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM21336 (เบสตำแหน่งที่ 9,151,105-9,151,271) และ RM21337 (เบสตำแหน่งที่ 9,184,423-9,184,462) จากนั้นแทรกแถวระหว่าง RM21336 และ RM21337 ทำแถบสีในบริเวณดังกล่าว สำหรับการอ้างอิงในการหา target linked marker

McCouch Locus_ID	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end
RM21329	NA	NA	NA	8,904,601	8,904,622
RM21330	CTCATGCTTTCAGTCATTCAGTGC	TCCTGGATTCATGGTGTCTTTAGC	269	8,910,448	8,910,503
RM21331	ATATGGTCATTGGCTGGGAAAGAGG	CACCATTATCCTGCGGGTAGGC	147	8,996,056	8,996,083
RM21332	CAAGAACACGCTGACACCATAAGC	GGCTACCTCGACTACGGCAACC	186	9,036,131	9,036,150
RM21333	ATTCCAACGGTCCAGTTCAGAGG	CACGCAGTGTGGTGTGGTAAGC	281	9,043,958	9,044,009
RM21334	GACTTGGGCGGCAGCTTATTCC	TGTTGTTCCACTCATCACACCTCTCC	356	9,071,275	9,071,310
RM5436	CAAAGGGGGTGTCCTCTATG	GTTGCTCGTCCTACATGTGC	NA	9,074,712	9,074,872
RM21335	TGAGCTGCACAAGACAGACAAGC	ACCATTTGAACAGGATGGACTGG	194	9,107,916	9,107,949
RM21336	GTGCTTGCATATAACCTATA	AGATCAACCTTCTTATTCAG	NA	9,151,105	9,151,271
	Ghd7			**9,151,408**	**9,175,046**
RM21337	NA	NA	NA	9,184,423	9,184,462
RM21338	NA	NA	NA	9,184,484	9,184,503
RM21339	CAGCTAGCTAGGGTTGTGAAATGC	GACCAAATCCATCCACAGATCG	196	9,187,154	9,187,174
RM21340	GGGAGAGCGAGAGCAAGAGAACG	TTGTTGTCAGTCTCCATGCCAATCC	289	9,275,340	9,275,359
RM21342	CTCCTGGTCGCAAGAAGAAGG	CAAACAACAGCATCAGCATCACC	334	9,427,766	9,427,786
RM21344	GGATGTTGTTCTAACCCGTCAGG	CGAACTCAACAGACTACCCATACCC	326	9,490,111	9,490,134
RM21345	GCATGCTAAGCTGTAGAAGTTAGTGG	GCTACATGTCACCGATCAGACC	389	9,522,000	9,522,029
RM21347	NA	NA	NA	9,538,686	9,538,735

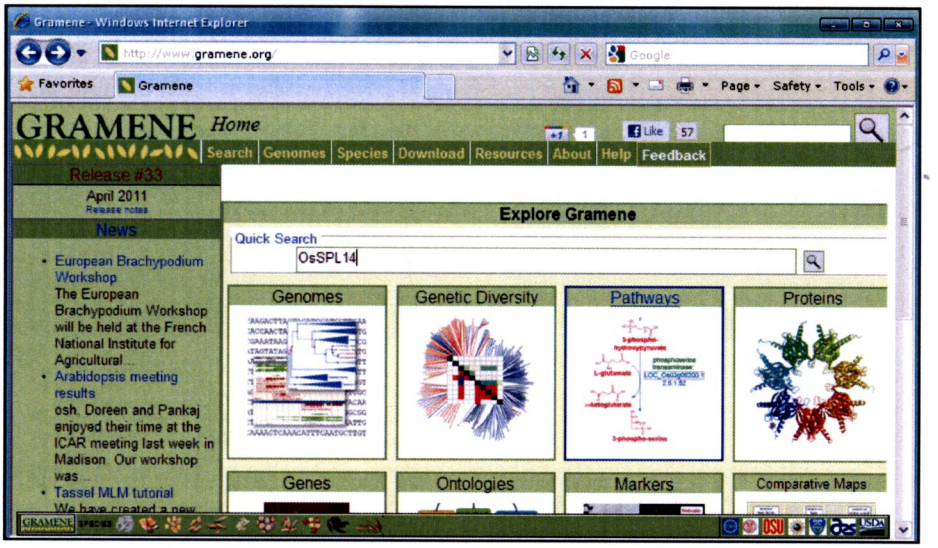
2.3.7 เปรียบเทียบจำนวนเบสของเครื่องหมายโมเลกุล SSR แต่ละตัวที่อยู่ใกล้กับยีน *Ghd7* เพื่อหา target linked marker ซึ่งมีระยะจากทั้งสองข้างของยีน *Ghd7* ได้ถึง 95,000 เบส แล้วทำสัญลักษณ์ด้วยแถบสี

2.3.8 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker โดยคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงไว้ในตาราง แล้วสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมดจากบริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด

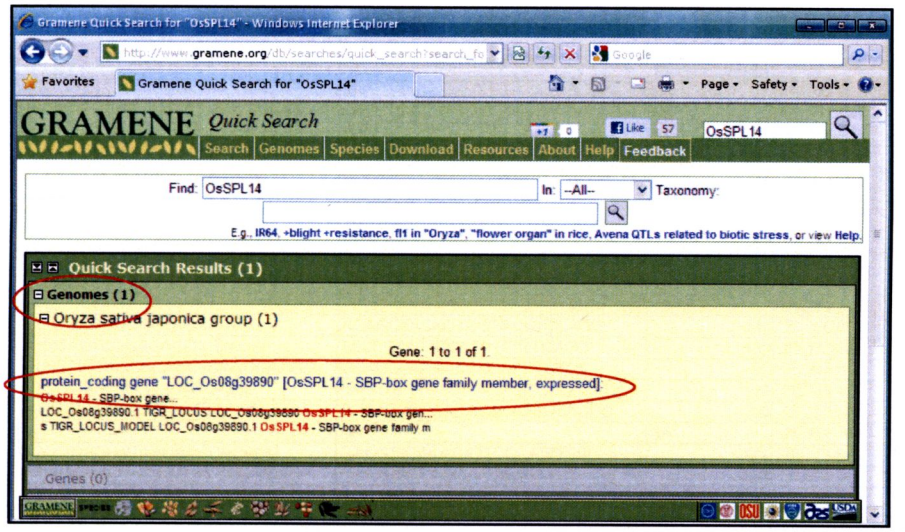
2.4 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP*

การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* จากตาราง supplementary table 18 มีขั้นตอนดังนี้

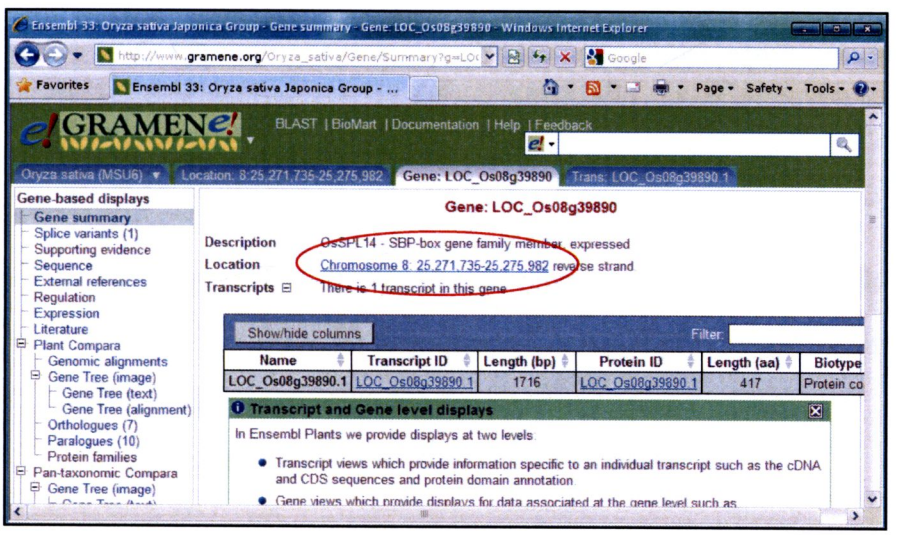
2.4.1 ค้นหาตำแหน่งของยีน *WFP* หรือยีน *OsSPL14* จากเว็บไซต์ Gramene ซึ่งมีรายงานว่าเป็นยีนที่แปลรหัสได้โปรตีน OsSPL14 (Miura *et al.*, 2010) โดยพิมพ์ OsSPL14 ในช่อง Quick Search แล้วกดค้นหา ดังภาพ



2.4.2 ผลการค้นหาปรากฏหน้าต่างซึ่งแสดงรายละเอียดของยีน *OsSPL14* แล้วเลือก Genome (1) จากนั้นเลือก protein_coding gene "LOC_Os08g39890" [OsSPL14 - SBP-box gene family member, expressed]:



2.4.3 ปรากฏหน้าต่างที่แสดงรายละเอียดของยีน *OsSPL14* รวมถึงตำแหน่งและลำดับเบสของยีน โดยยีน *OsSPL14* หรือยีน *WFP* นั้นตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 ตำแหน่งเบสที่ 25,271,735-25,275,982



2.4.4 เปิดตาราง supplementary table 18 ด้วยโปรแกรม excel แล้วหาตำแหน่งของยีน *WFP* คือที่ตำแหน่งเบส 25,271,735-25,275,982 โดยเลือกบริเวณที่ใกล้เคียงมากที่สุด ซึ่งจากตารางยีน *WFP* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM23425 (เบสตำแหน่งที่ 25,271,025-25,271,045) และ RM23426 (เบสตำแหน่งที่ 25,320,052-25,320,072) จากนั้นแทรกแถวระหว่าง RM23425 และ RM23426 ทำแถบสีในบริเวณดังกล่าว สำหรับการอ้างอิงในการหา target linked marker

McCouch Locus_ID	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end
RM23416	NA	NA	NA	25,214,834	25,214,877
RM23417	NA	NA	NA	25,214,907	25,214,930
RM23418	NA	NA	NA	25,214,933	25,214,958
RM23419	ACCTGAGCTCGATGGTTCTTTCC	GCTCCCACCAAGTATTCCTATCG	263	25,222,439	25,222,522
RM23420	GATGGGACATTCAATTCACTCG	GACTGTGCAGGAGTAGCAGTAGTACG	371	25,232,869	25,232,888
RM23421	ATGGACATGTGGTTAAGCATCG	TGCCAAGTAAGGACATACTCTACTCC	234	25,246,335	25,246,372
RM23422	GTCGGTCACGAAGTTCAGATCC	TCAGGCAAAGTTGAAGATGGTAGC	186	25,246,687	25,246,706
RM23423	CGGCGGATAGTTAAAGAAGATCG	GCAGGTTACCGCAATAGCATCC	191	25,256,213	25,256,232
RM23424	NA	NA	NA	25,257,284	25,257,311
RM23425	TGGCGGCAGTAGTAGTTCTTGATCC	GCCGTCCTCGTCTTCCAAGG	168	25,271,025	25,271,045
	WFP			**25,271,735**	**25,275,982**
RM23426	CATCATGTCGCGGTAGAACTCG	AGAGGTACAGTGGCACGATCAGG	131	25,320,052	25,320,072
RM23427	AGGGAGTCGGAGACCATGACG	TACCGCGTATCATGTCCTTGACG	150	25,333,966	25,333,986
RM23428	ACAGTACTAGCACAGCTGAAGGAAGG	GCAGCGATAACCACATTTCTTGC	85	25,344,812	25,344,832
RM23429	CGGCGAGGTAGAAGGTGACG	CAGTGATTGTGTGACAGTGTGAGAGG	196	25,346,453	25,346,473
RM23430	AAAGCTAGCCCAGGGTGAAGC	GAAATGGACAGAGGTATGGTACGC	300	25,351,278	25,351,305
RM23431	NA	NA	NA	25,352,109	25,352,128
RM23432	GCCTTGAGGATAAGAACCACAGG	GAGGTTGGTAGATTCGCATTTGG	174	25,373,578	25,373,598
RM23433	CTGCAACACCAGTAACTCTAGATCG	CCAAGAACAGCAAGAACAACC	262	25,373,795	25,373,838
RM23434	GGAATCCGGTACCACGAGAAGG	TCTCCTCTCAAGGATCCAAAGACC	102	25,394,421	25,394,452
RM23435	CACGTTACATAGCTCACCATACACG	GTAACGTTGTCAGCCCTCTGTCC	397	25,407,113	25,407,132
RM23436	TGAGTCACCGTGCACCATCTCC	GTGGTGGTGCGAATCACTGTAGG	170	25,474,448	25,474,467

2.4.5 เปรียบเทียบจำนวนเบสของเครื่องหมายโมเลกุล SSR แต่ละตัวที่อยู่ใกล้กับยีน *WFP* เพื่อหา target linked marker ซึ่งมีระยะจากทั้งสองข้างของยีน *WFP* ได้ถึง 95,000 เบส แล้วทำสัญลักษณ์ด้วยแถบสี

2.4.6 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker โดยคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงไว้ในตาราง แล้วสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมดจากบริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง และคัดเลือกเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 และชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้พันธุ์แปดริ้ว และเมืองไทร

เมื่อทำการคัดเลือกได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แต่ละยีน แล้วทำการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละเครื่องหมาย เพื่อตรวจสอบว่าเครื่องหมายโมเลกุลใดสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 และชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ แปดริ้ว และเมืองไทรได้ ด้วยขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

3.1 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้กับข้าวพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้ คือ พันธุ์แปดริ้ว

3.1.1 เมื่อต้นข้าวพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว มีอายุ 15 วัน นำใบข้าวแต่ละต้นมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างของจีโนไทป์ระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป genomic DNA purification kit ของบริษัท Fermentas

3.1.2 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 พันธุ์แปดริ้ว และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์แปดริ้วซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมดังกล่าวเป็นแม่พิมพ์ โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 1.5 µl สารละลาย 2x Promega's PCR green master mix (ประกอบด้วย 400 µM dNTPs reaction buffer (pH 9) 3 mM $MgCl_2$ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.1 units/µl) ปริมาตร 7.5 µl สารละลายไพรเมอร์ชนิด forward และ reverse ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แต่ละเครื่องหมาย ที่ความเข้มข้น 3 µM ปริมาตร 2 µl และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ปริมาตร 2 µl รวมปริมาตรทั้งหมด เท่ากับ 15 µl เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น PCT-100 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอน predenaturing แล้วเริ่มต้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในรอบที่ 1 ด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำอีกจำนวน 35 รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รวมระยะเวลาการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที

3.1.3 วิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรส (agarose) ที่ความเข้มข้น 4% ในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นย้อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 10 นาที ล้างสีย้อมส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc 2000 (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟท์แวร์ Quantity One (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

3.1.4 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว ในกรณีที่ไม่พบเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ ต้องทำการหา และคัดเลือกเครื่องหมาย

โมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีนจากตาราง supplementary table 18 เพิ่ม แล้วทำการตรวจสอบด้วยวิธีการดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

3.2 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้กับข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 และพันธุ์ให้ คือ พันธุ์เมืองไทร

3.2.1 เมื่อต้นข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 และพันธุ์ให้เมืองไทร มีอายุ 15 วัน นำใบข้าวแต่ละต้นมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างของจีโนไทป์ระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป genomic DNA purification kit ของบริษัท Fermentas

3.2.2 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 พันธุ์เมืองไทร และดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์เมืองไทรซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F_1 ของคู่ผสมดังกล่าวเป็นแม่พิมพ์ โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 µl สารละลาย 2x Promega's PCR green master mix (ประกอบด้วย 400 µM dNTPs reaction buffer (pH 9) 3 mM $MgCl_2$ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.1 units/µl) ปริมาตร 7.5 µl สารละลายไพรเมอร์ชนิด forward และ reverse ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แต่ละเครื่องหมาย ที่ความเข้มข้น 3 µM ปริมาตร 2 µl และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ปริมาตร 2 µl รวมปริมาตรทั้งหมด เท่ากับ 15 µl เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น PCT-100 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอน predenaturing แล้วเริ่มต้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในรอบที่ 1 ด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำอีกจำนวน 35 รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รวมระยะเวลาการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที

3.2.3 วิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรส (agarose) ที่ความเข้มข้น 4% ในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นย้อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 10 นาที ล้างสีย้อมส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc 2000 (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟท์แวร์ Quantity One (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

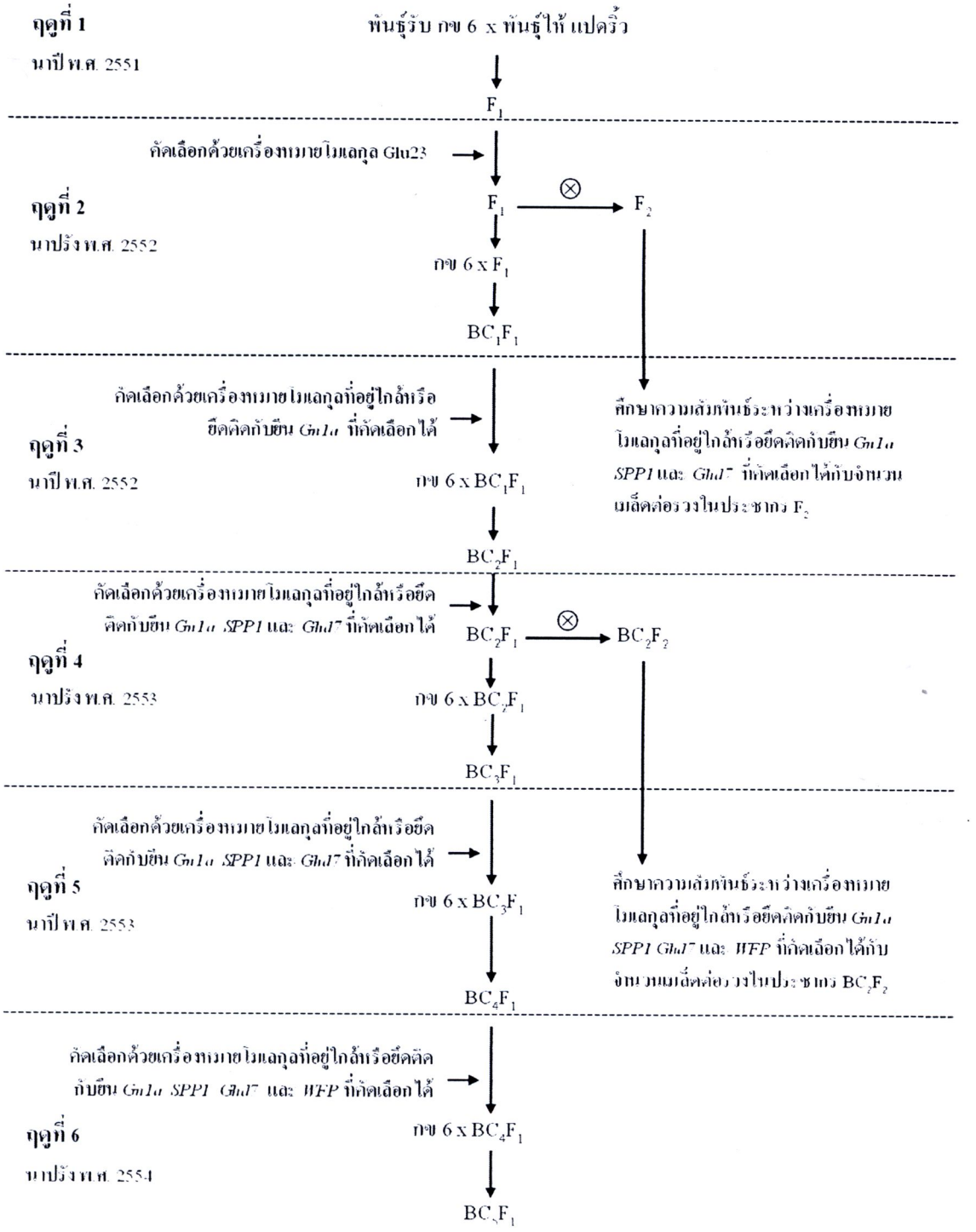
3.2.4 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร ในกรณีที่ไม่พบเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ ต้องทำการหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีนจากตาราง supplementary table 18 เพิ่ม แล้วทำการตรวจสอบด้วยวิธีการดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

การทดลองที่ 4 สร้างประชากรตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ได้แก่ ประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว ประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร

ทำการสร้างประชากรของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว และคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ซึ่งได้วางแผนการผสมพันธุ์ข้าว และสร้างประชากรของทั้งสองคู่ผสม ดังนี้

4.1 คู่ผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับพันธุ์แปดริ้ว

วางแผนการผสมพันธุ์ข้าวของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้พันธุ์แปดริ้ว จำนวน 6 ฤดู ดังภาพ 9 ฤดูที่ 1 ทำการผสมพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ย 207 เมล็ด ซึ่งใช้เป็นพันธุ์รับ กับข้าวพันธุ์ให้ คือ พันธุ์แปดริ้วที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ย 266 เมล็ด ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 เพื่อผลิตเมล็ด F_1 แล้วทำการคัดเลือกต้น F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Glu23 ซึ่งใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ระหว่างข้าวเหนียว และข้าวเจ้า (Wanchana *et al.*, 2003 อ้างโดย เจตศรัณย์, 2550) ในฤดูที่ 2-6 ทำการผสมกลับ 5 ครั้ง แล้วทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละชั่ว ซึ่งในฤดูที่ 3 ทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* เท่านั้น เนื่องจากยังไม่พบเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* และ *Ghd7* แต่ในฤดูที่ 4-5 สามารถหาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* และ *Ghd7* ได้เพิ่มเติมจึงใช้คัดเลือกต้น BC_2F_1 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส หลังจากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ตามลำดับ



ภาพ 9 แสดงแผนผังการสร้างประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

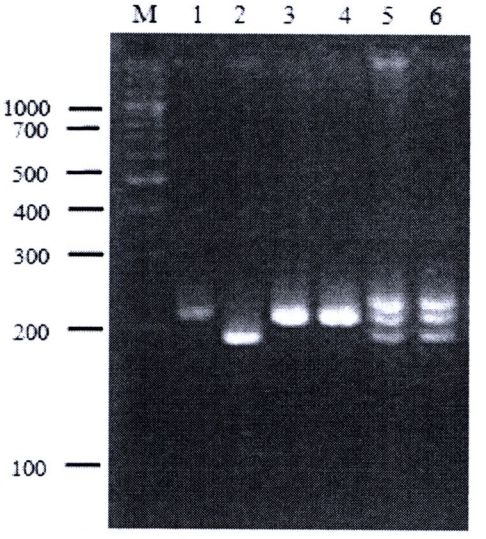
ในฤดูที่ 6 มีรายงานวิจัยของยีน *WFP* จึงทำการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* เพื่อใช้คัดเลือกต้น BC_4F_1 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส หลังจากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ นอกจากนี้ในฤดูที่ 2 ทำการผสมตัวเองของต้น F_1 เพื่อผลิตเมล็ด F_2 สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 3 และในฤดูที่ 4 ได้ทำการผสมตัวเองของต้น BC_2F_1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_2 สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5

การคัดเลือกต้น F_1 และต้น BC_nF_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้ว โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ กข 6 ข้าวพันธุ์แปดริ้ว F_1 และ BC_nF_1 โดยใช้ชุดสำหรับสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Genomic DNA Purification Kit ของบริษัท Fermentas) ดังวิธีการสกัดของบริษัท จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 เป็นไพรเมอร์ ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว แล้วตรวจผลผลิตของพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก ได้แก่

(1) เครื่องหมายโมเลกุล Glu23 (Wanchana *et al.*, 2003 อ้างโดย เจตศรัณย์, 2550) ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 ซึ่งเป็นข้าวเหนียว กับข้าวพันธุ์ให้แปดริ้วซึ่งเป็นข้าวเจ้า โดยในแต่ละปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย สารละลาย 2x Promega's PCR green master mix (ประกอบด้วย 400 µM dNTPs reaction buffer (pH 9) 3 mM $MgCl_2$ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.1 units/µl) ปริมาตร 7.5 µl สารละลายไพรเมอร์ Glu23 ชนิด forward และ reverse ที่ความเข้มข้น 5 µM ปริมาตร 2 µl และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ปริมาตร 3.5 µl รวมปริมาตรทั้งหมด เท่ากับ 15 µl เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น PCT-100 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอน predenaturing แล้วเริ่มต้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในรอบที่ 1 ด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำอีกจำนวน 35 รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และระยะ final extension

ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รวมระยะเวลาการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสตามวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ทำการคัดเลือกต้น F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เป็นพันธุ์รับและข้าวเจ้าพันธุ์แปดริ้วที่เป็นพันธุ์ให้ ดังแสดงในภาพ 10



ภาพ 10 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์เมื่อใช้ Glu23 เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ สัญลักษณ์กำกับ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวเจ้าพันธุ์แปดริ้ว และเลนที่ 3-6 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของต้น F_1 ซึ่งต้นที่คัดเลือกได้อยู่ในเลนที่ 5 และ 6 เพราะมีขนาดของแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์เท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว

(2) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่คัดเลือกได้ คือ RM10318 ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว ทำการคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว

(3) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* ที่คัดเลือกได้ คือ RM10395 ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว ทำการคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว

(4) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ คือ RM21335 ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว ทำการคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว

(5) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* ที่คัดเลือกได้ คือ RM23428 ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว ทำการคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว

วิธีการคัดเลือกต้น F_1 และต้น BC_nF_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลนั้นมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1.1 การคัดเลือกต้น F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์รับ และข้าวพันธุ์ให้ คือ พันธุ์แปดริ้วที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ถูกนำมาคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Glu23 ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 ซึ่งเป็นข้าวเหนียว กับพันธุ์ให้พันธุ์แปดริ้ว ซึ่งเป็นข้าวเจ้า โดยคัดเลือกต้น F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว แสดงว่าเป็นต้นที่ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวเองของต้น กข 6 จากนั้นนำต้น F_1 ที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์รับ กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1 ขณะเดียวกันทำการผสมตัวเองของต้น F_1 เพื่อผลิตเมล็ด F_2 สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 3

4.1.2 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น BC_1F_1 ที่ได้จากข้อ 4.1.1 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล คือ RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* เพียงเครื่องหมายเดียว เนื่องจากยังไม่พบเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* และ *Ghd7* การคัดเลือกดำเนินการเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น โดยคัดเลือกต้น BC_1F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว แสดงว่าเป็นต้นที่ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวเองของต้น กข 6 และได้รับอัลลีลของยีน *Gn1a* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริ้ว จากนั้นนำต้น BC_1F_1 ที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1

4.1.3 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น BC_2F_1 ที่ได้จากข้อ 4.1.2 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ทำการคัดเลือกต้น BC_2F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว แสดงว่าเป็นต้นที่ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวเองของต้น กข 6 และได้รับอัลลีลของยีน *Gn1a* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริ้ว จากนั้นนำต้น BC_2F_1 ที่คัดเลือกได้ทำการคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* โดยทำการคัดเลือกต้น BC_2F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลีลของยีน *SPP1* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริ้ว จากนั้นทำการคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM21335 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* โดยคัดเลือกต้น BC_2F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลีลของยีน *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริ้ว ดังนั้นต้น BC_2F_1 ที่คัดเลือกได้นี้จะมียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญสามยีนที่ได้รับจากพันธุ์ให้แปดริ้ว คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แล้วผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_1 ต่อไป ขณะเดียวกันทำการผสมตัวเองของต้น BC_2F_1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_2 สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5

4.1.4 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น BC_3F_1 ที่ได้จากข้อ 4.1.3 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ ดังเช่นวิธีการเดียวกับข้อ 4.1.3 ซึ่งต้น BC_3F_1 ที่คัดเลือกได้จะมียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญสามยีนที่ได้รับจากพันธุ์ให้แปดริ้ว คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แล้วผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_4F_1 ต่อไป ขณะเดียวกันทำการผสมตัวเองของต้น BC_3F_1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_2

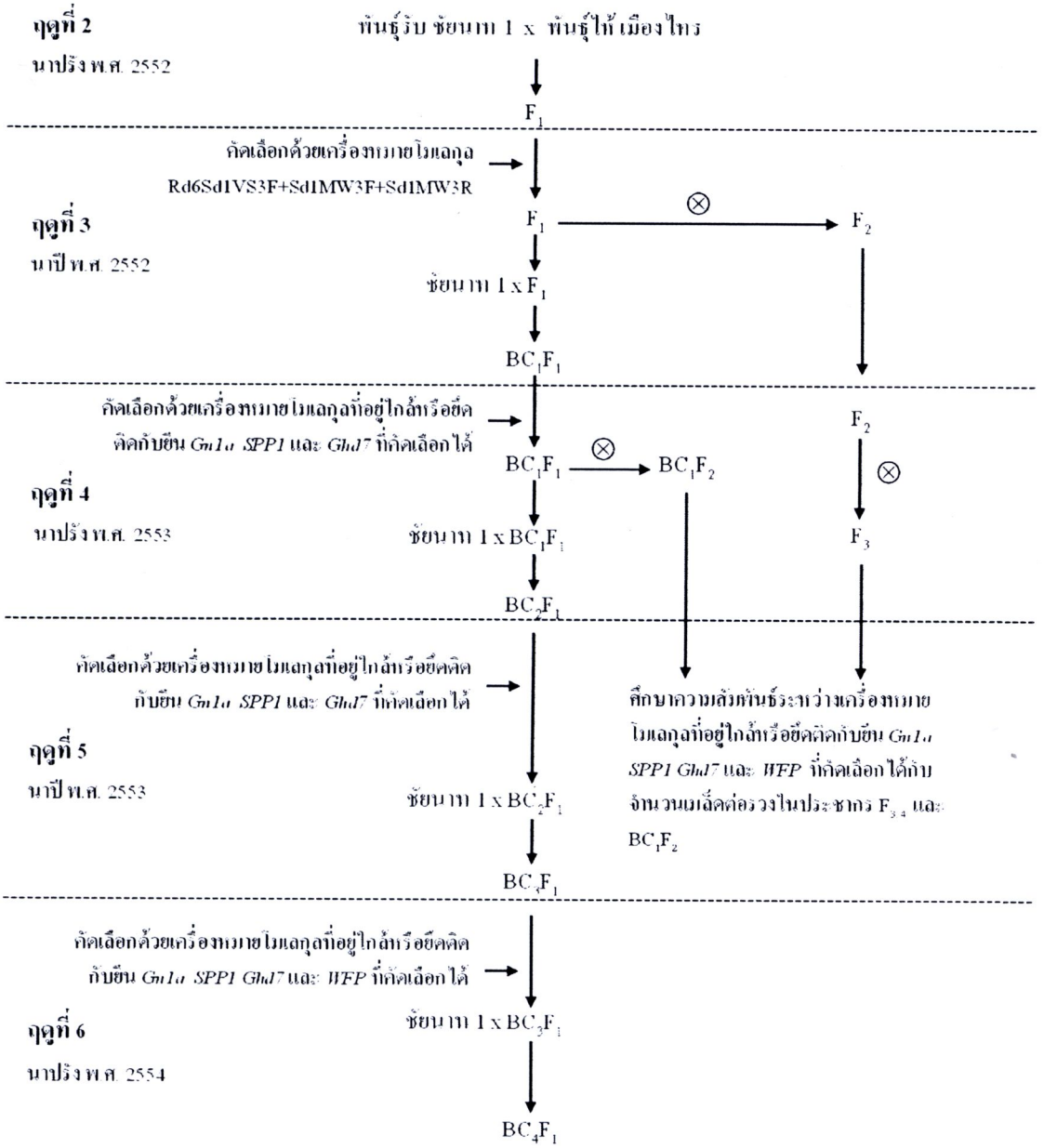
4.1.5 การคัดเลือกต้น BC_4F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น BC_4F_1 ที่ได้จากข้อ 4.1.4 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM23428 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* คัดเลือกต้น BC_4F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว แสดงว่าเป็นต้นที่ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวเองของต้น กข 6 และได้รับอัลลีลของยีน *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริ้ว จากนั้นนำต้น BC_4F_1 ที่คัดเลือกได้ทำการคัดเลือกต่อด้วย

เครื่องหมายโมเลกุล RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* โดยคัดเลือกต้น BC_4F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลีลของยีน *SPP1* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริ้ว จากนั้นทำการคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* คัดเลือกต้น BC_4F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลีลของยีน *Gn1a* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริ้ว และคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมาย RM21335 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* คัดเลือกต้น BC_4F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลีลของยีน *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริ้ว ดังนั้นต้น BC_4F_1 ที่คัดเลือกได้นี้จะมียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยีนที่ได้รับจากพันธุ์ให้แปดริ้ว คือ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แล้วทำการผสมตัวเองของต้น BC_4F_1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_4F_2 สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงต่อไป

4.2 คู่ผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับพันธุ์เมืองไทร

วางแผนการผสมพันธุ์ข้าวของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับพันธุ์เมืองไทร ดังภาพ 11 โดยเริ่มต้นการผสมในฤดูที่ 2 ทำการผสมพันธุ์ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ย 133 เมล็ด ใช้เป็นพันธุ์รับ กับข้าวพันธุ์ให้ คือ พันธุ์เมืองไทรที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ย 338 เมล็ด ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 เพื่อผลิตเมล็ด F_1 แล้วทำการคัดเลือกต้น F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R (กมลทิพย์, 2551) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวต้นเตี้ย (113 เซนติเมตร) กับข้าวพันธุ์เมืองไทรที่เป็นข้าวต้นสูง (166 เซนติเมตร) ในฤดูที่ 3-6 ทำการผสมกลับ 4 ครั้ง แล้วทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละชั่ว ซึ่งในฤดูที่ 3-5 ทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* เท่านั้น และในฤดูที่ 6 มีรายงานวิจัยของยีน *WFP* จึงทำการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* เพื่อใช้คัดเลือกต้น BC_3F_1 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบเฮทเทอโรไซกัส หลังจากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ



ภาพ 11 แสดงแผนผังการสร้างประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

นอกจากนี้ในฤดูที่ 3 ทำการผสมตัวเองของต้น F_1 เพื่อผลิตเมล็ด F_2 จากนั้นนำไปปลูกในฤดูที่ 4 แล้วทำการผสมตัวเองของต้น F_2 เพื่อผลิตเมล็ด F_3 เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุม

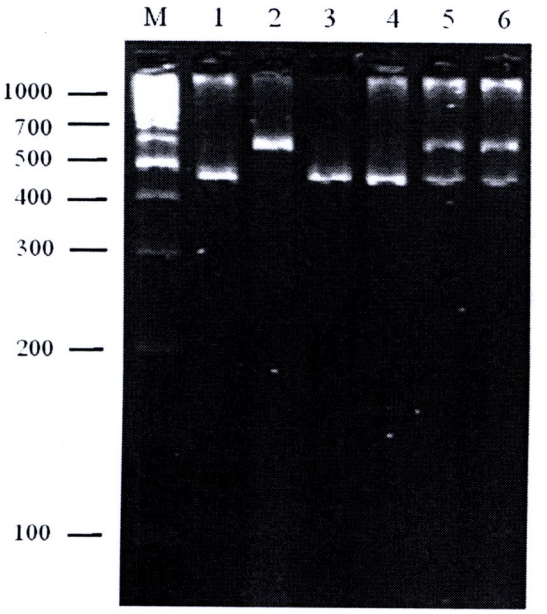
ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5 สำหรับในฤดูที่ 4 ทำการผสมตัวเองของต้น BC_1F_1 ที่คัดเลือกได้ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* มี จีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_2 สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5

การคัดเลือกต้น F_1 และต้น BC_nF_1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ข้าวพันธุ์เมืองไทร F_1 และ BC_nF_1 โดยใช้ชุดสำหรับสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Genomic DNA Purification Kit ของบริษัท Fermentas) ดังวิธีการสกัดของบริษัท จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 เป็นไพรเมอร์ ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทร แล้วตรวจผลผลิตของพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก ได้แก่

(1) เครื่องหมายโมเลกุล Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R (กมลทิพย์, 2551) ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวต้นเตี้ยมีความสูง 113 เซนติเมตร กับข้าวพันธุ์ให้เมืองไทรซึ่งเป็นข้าวต้นสูงมีความสูง 166 เซนติเมตร โดยในแต่ละปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย สารละลาย 2x Promega's PCR green master mix (ประกอบด้วย 400 µM dNTPs reaction buffer (pH 9) 3 mM $MgCl_2$ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.1 units/µl) ปริมาตร 7.5 µl สารละลายไพรเมอร์ Rd6Sd1VS3F และไพรเมอร์ Sd1MW3 ชนิด forward และ reverse ที่ความเข้มข้น 5 µM ปริมาตร 1.3 µl และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ปริมาตร 3.5 µl รวมปริมาตรทั้งหมด เท่ากับ 14.9 µl เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น PCT-100 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอน predenaturing แล้วเริ่มต้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในรอบที่ 1 ด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำอีกจำนวน 35 รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รวมระยะเวลาการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสตามวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น แล้วทำการคัดเลือกต้น F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบ

เฮทเทอโรไซกัส ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เป็นพันธุ์รับ และข้าวพันธุ์เมืองไทรที่เป็นพันธุ์ให้ ดังแสดงในภาพ 12



ภาพ 12 ภาพอะกาโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์เมื่อใช้ Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ สัญลักษณ์กำกับ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์เมืองไทร เลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ที่ใช้ดีเอ็นเอผสมของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์เมืองไทร แทนตัวอย่าง F_1 เลนที่ 4-6 คือ แถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของต้น F_1 ซึ่งต้นที่คัดเลือกได้อยู่ในเลนที่ 5 และ 6 เพราะมีขนาดของแถบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์เท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร

(2) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่คัดเลือกได้ คือ RM10316 ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับชัยนาท 1 และพันธุ์ให้เมืองไทร ทำการคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร

(3) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* ที่คัดเลือกได้ คือ RM10402 ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับชัยนาท 1 และพันธุ์ให้เมืองไทร

ทำการคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร

(4) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ คือ RM21330 ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับชัยนาท 1 และพันธุ์ให้เมืองไทร ทำการคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร

(5) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* ที่คัดเลือกได้ คือ RM23433 ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับชัยนาท 1 และพันธุ์ให้เมืองไทร ทำการคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัสที่แสดงแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร

วิธีการคัดเลือกต้น F_1 และต้น BC_nF_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลนั้นมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.2.1 การคัดเลือกต้น F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์รับ และข้าวพันธุ์ให้ คือพันธุ์เมืองไทร ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ถูกนำมาคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวต้นเตี้ย กับพันธุ์ให้ พันธุ์เมืองไทร ซึ่งเป็นข้าวต้นสูง โดยคัดเลือกต้น F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร แสดงว่าเป็นต้นที่ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวเองของต้นชัยนาท 1 จากนั้นนำต้น F_1 ที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1 ขณะเดียวกันทำการผสมตัวเองของต้น F_1 เพื่อผลิตเมล็ด F_2 สำหรับใช้สร้างประชากร F_2 ในฤดูที่ 4 เพื่อผลิตเมล็ด F_3 สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5

4.2.2 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น BC_1F_1 ที่ได้จากข้อ 4.2.1 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM10316 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* โดยคัดเลือกต้น BC_1F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร แสดงว่าเป็นต้นที่ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวเองของต้นชัยนาท 1 และได้รับอัลลีลของยีน *Gn1a* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้เมืองไทร จากนั้นนำต้น BC_1F_1 ที่คัดเลือกได้ทำการคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10402 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* คัดเลือกต้น

BC_1F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลีลของยีน *SPP1* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้เมืองไทร ทำการคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* คัดเลือกต้น BC_1F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลีลของยีน *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้เมืองไทร ดังนั้นต้น BC_1F_1 ที่คัดเลือกได้นี้จะมียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญสามยีนที่ได้รับจากพันธุ์ให้เมืองไทร คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แล้วผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1 ต่อไป ขณะเดียวกันทำการผสมตัวเองของต้น BC_1F_1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_2 เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5

4.2.3 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น BC_2F_1 ที่ได้จากข้อ 4.2.2 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ ดังเช่นวิธีการเดียวกับข้อ 4.2.2 ซึ่งต้น BC_2F_1 ที่คัดเลือกได้จะมียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญสามยีนที่ได้รับจากพันธุ์ให้เมืองไทร คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แล้วผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_1 ต่อไป ขณะเดียวกันทำการผสมตัวเองของต้น BC_2F_1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_2

4.2.4 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น BC_3F_1 ที่ได้จากข้อ 4.2.3 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ ดังเช่นวิธีการเดียวกับข้อ 4.2.3 จากนั้นคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM23433 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* ทำการคัดเลือกต้น BC_3F_1 ที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอของทั้งชัยนาท 1 และเมืองไทร ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลีลของยีน *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้เมืองไทร ดังนั้นต้น BC_3F_1 ที่คัดเลือกได้จะมียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญสี่ยีนที่ได้รับจากพันธุ์ให้เมืองไทร คือ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แล้วทำการผสมตัวเองของต้น BC_3F_1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_2 สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงต่อไป

4.3 การผลิตเมล็ดเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

การผลิตเมล็ดเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง ใช้เมล็ด F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้วที่ผลิตได้ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2552 และฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 ตามลำดับ สำหรับคู่ผสมของข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทรใช้เมล็ด F_3 และ BC_1F_2 ที่ผลิตได้ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 ทำการสร้างประชากรจากเมล็ดดังกล่าวเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากรดังกล่าวในฤดูนาปี พ.ศ. 2553

การทดลองที่ 5 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์แปดริ้ว

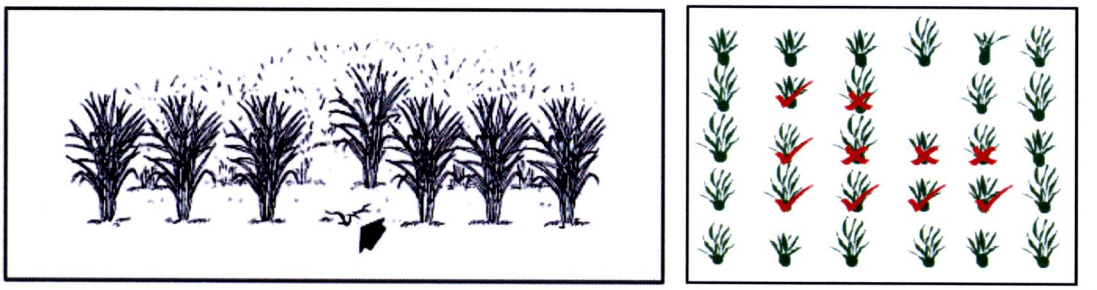
ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยีน ได้แก่ ยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือพันธุ์แปดริ้ว โดยทำการศึกษาทั้งหมดสองฤดู ได้แก่ ฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2552 ใช้ประชากร F_2 และฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553 ใช้ประชากร BC_2F_2 ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ได้จากข้อมูลฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ของประชากรดังกล่าว

5.1 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

5.1.1 การเก็บข้อมูลฟีโนไทป์

ทำการเก็บข้อมูลฟีโนไทป์โดยสุ่มเก็บรวงข้าวของต้น F_2 และ BC_2F_2 ที่มีอัตราการแข่งขันเท่ากัน กล่าวคือ เก็บตัวอย่างต้นข้าวที่มีต้นข้าวกออื่นขนาบข้างครบทั้งสี่ด้าน หรือในกรณีที่มีต้นข้าวตาย ห้ามเก็บต้นข้าวกอที่อยู่ด้านข้างทั้งสี่ด้าน ดังภาพ 13 เนื่องจากต้นข้าวดังกล่าวจะได้รับอาหารมากกว่าต้นข้าวที่มีต้นข้าวกออื่นขนาบข้างครบทั้งสี่ด้าน ข้อมูลที่ได้จึงคลาดเคลื่อน ทำการ

รวบรวมรวงข้าวทั้งหมดในแต่ละกอ แล้วเก็บรวงข้าวที่อยู่บนตำแหน่งสูงที่สุดของแต่ละกอ จำนวน 5 รวง ทำการแยกเก็บแต่ละกอ จากนั้นทำการนับจำนวนเมล็ดดี และเมล็ดลีบรวมกันทั้งหมด แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรวงสำหรับแต่ละต้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลฟีโนไทป์สำหรับการวิเคราะห์



ภาพ 13 แสดงแผนภาพการเก็บตัวอย่างต้นข้าวที่มีอัตราการแข่งขันเท่ากัน

หมายเหตุ เครื่องหมายถูกแสดงต้นข้าวที่สามารถใช้เป็นตัวอย่างได้ และเครื่องหมายกากบาทแสดงต้นข้าวที่ไม่สามารถใช้เป็นตัวอย่างได้

ที่มา: Gomez (1972)

5.1.2 การตรวจสอบจีโนไทป์

ทำการตรวจสอบจีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยีน ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.1 ได้แก่ ยีน *Gn1a* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10318 ยีน *SPP1* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10395 ยีน *Ghd7* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM21335 และยีน *WFP* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM23428 โดยประชากร F_2 และ BC_2F_2 จะมีการกระจายตัวของยีนได้จีโนไทป์ 3 แบบ คือ homozygous ของพันธุ์รับ homozygous ของพันธุ์ให้ และ heterozygous ซึ่งตัวอย่างต้นข้าวที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 ต้นข้าวที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 และต้นข้าวที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 เพื่อใช้เป็นข้อมูลของจีโนไทป์สำหรับการวิเคราะห์

5.1.3 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

นำข้อมูลฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ (regression) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญ

ทั้งสี่ยีน ได้แก่ ยีน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้ กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี single regression analysis เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือไม่ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป statistical analysis system (SAS) version 8 ในการวิเคราะห์

5.2 การวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

ทำการวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่งด้วยวิธี multiple-locus regression analysis เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนทั้งหมดนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุดในประชากร F_2 และ BC_2F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับพันธุ์แปดริ้ว

การทดลองที่ 6 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์เมืองไทร

ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยีน ได้แก่ ยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้พันธุ์เมืองไทร ทำการศึกษาในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553 โดยใช้ประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ได้จากข้อมูลฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ของประชากรดังกล่าว

6.1 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

6.1.1 การเก็บข้อมูลฟีโนไทป์

ทำการเก็บข้อมูลฟีโนไทป์โดยทำการสุ่มเก็บรวงข้าวของต้น $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ที่มีอัตราการแข่งขันเท่ากัน เช่นเดียวกับการเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ในข้อที่ 5.1.1 ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

6.1.2 การตรวจสอบจีโนไทป์

ทำการตรวจสอบจีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยีน ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.2 ได้แก่ ยีน *Gn1a* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10316 ยีน *SPP1* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10402 ยีน *Ghd7* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM21330 และยีน *WFP* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM23433 โดยประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 จะมีการกระจายตัวของยีนได้จีโนไทป์ 3 แบบ คือ homozygous ของพันธุ์รับ homozygous ของพันธุ์ให้ และ heterozygous ซึ่งตัวอย่างต้นข้าวที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 ต้นข้าวที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 และต้นข้าวที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 เพื่อใช้เป็นข้อมูลของจีโนไทป์สำหรับการวิเคราะห์

6.1.3 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

นำข้อมูลฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ (regression) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยีน ได้แก่ ยีน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้ กับจำนวนเมล็ดต่อรวงด้วยวิธี single regression analysis เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวงหรือไม่ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป statistical analysis system (SAS) version 8 ในการวิเคราะห์ข้อมูล

6.2 การวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

ทำการวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่งด้วยวิธี multiple-locus regression analysis เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนแต่ละยีนทั้งหมดนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุดในประชากร $F_{3:4}$ และ BC_1F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับพันธุ์เมืองไทร

สถานที่ และระยะเวลาในการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

1. การวิจัยทางด้านชีวโมเลกุล ทำงานวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุลของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่

2. การวิจัยทางด้านการผสมพันธุ์ข้าว ทำการผสมพันธุ์ข้าวที่โรงเรือนกระจกของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่

3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง ทำการศึกษาในพื้นที่บริเวณฟาร์มวิจัย และพัฒนาการผลิตพืชไร่ของภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่

ระยะเวลาการทำวิจัย

การศึกษาเรื่องการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีเมล็ดต่อรวงมากนี้ ใช้ระยะเวลาประมาณ 3 ปี 4 เดือน โดยเริ่มตั้งแต่เดือน มีนาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2554