

## บทที่ 3

### วิธีการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远端ติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วงกับจำนวนเมล็ดต่อร่วงในกลุ่มประชากรตัวอย่างเพื่อการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีเมล็ดต่อร่วงมาก ใช้ข้าวพันธุ์รับ กข 6 ซึ่งมีเมล็ดต่อร่วงเท่ากับ 207 เมล็ด และพันธุ์ชัยนาท 1 มีเมล็ดต่อร่วง 133 เมล็ด เพื่อสร้างประชากรตัวอย่างในการศึกษา โดยทำการคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้จากข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อร่วงของข้าวพันธุ์พื้นเมืองต่างๆ ที่มีจำนวนเมล็ดต่อร่วงมาก (รากรณ์, 2551) รวมถึงค้นคว้าข้อมูลของยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วงที่สำคัญทั้งสี่ยีนที่เคยมีรายงาน ได้แก่ ยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แล้วสืบค้นตำแหน่งของยีนดังกล่าวจากฐานข้อมูลข้าวเพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远端ติดกับตำแหน่งของยีนดังกล่าว ซึ่งเป็น target linked marker และนำมาทดสอบหาความแตกต่างของลำดับเบสในบริเวณยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ เพื่อใช้คัดเลือกต้นข้าวที่ได้รับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วงที่สำคัญทั้งสี่ยีนจากพันธุ์ให้ในการสร้างประชากรตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远端ติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วงกับจำนวนเมล็ดต่อร่วงในประชากรดังกล่าว ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของแต่ละยีนที่คัดเลือก ได้แก่ จำนวนเมล็ดต่อร่วงด้วยวิธี single regression และ multiple-locus regression เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือ远端ติดกับยีนนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วงมากที่สุด เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีเมล็ดต่อร่วงมากได้ต่อไป

#### การศึกษานี้ทำการทดลองทั้งหมด 6 การทดลอง คือ

1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ (donor parent) ที่มีจำนวนเมล็ดต่อร่วงมาก เพื่อใช้สร้างกลุ่มประชากรตัวอย่างสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远端ติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วงกับจำนวนเมล็ดต่อร่วงในประชากรตัวอย่างที่สร้างขึ้น

2. การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือ远端ติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วง

3. การตรวจสอบเครื่องหมายโนเลกุลชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง และคัดเลือกเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 และชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้พันธุ์แปรรูป และเมืองไทย

4. สร้างประชากรตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง กับจำนวนเมล็ดต่อรวง ได้แก่ ประชากร  $F_2$  และ  $BC_2F_2$  ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปรรูป ประชากร  $F_{3:4}$  และ  $BC_1F_2$  ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้เมืองไทย

5. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร  $F_2$  และ  $BC_2F_2$  ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์แปรรูป

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

### อุปกรณ์ และสารเคมีในการวิจัย

#### 1. ขั้นตอนการปลูกข้าว และผสมพันธุ์ข้าว

1.1 กระถางไม่มีรูขนาด 12 นิ้ว

1.2 ดิน

1.3 ขอบ

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 ปากกีบ

- 1.13 กรรไกรตัดแต่งเมล็ด
- 1.14 กล่องพลาสติก
- 1.15 ภาชนะน้ำร้อน
- 1.16 ป้าย (Tag) และเชือกผูกป้าย
- 1.17 ดินสอ ยางลบ สมุดบันทึก
- 1.18 แอลงกอหอล์
- 1.19 ตู้เก็บเมล็ดพันธุ์
- 1.20 หม้อนั่งม่าเชื้อ
- 1.21 ตู้ปลูกเชื้อ
- 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 ห้องมีดควบคุมความยาวของช่วงแสง

## 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 หรือเจลอะลีก์โตร โฟร์ซิส (gel electrophoresis units)

- 2.10 เครื่องสำรองไฟ (power supply)
- 2.11 น้ำกลันที่ม่าเชื้อแล้ว
- 2.12 หม้อนั่งม่าเชื้อด้วยไอน้ำ (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 ขวดคูเรน ขนาด 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
- 2.19 ขวดรูปชามพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 2.20 เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (hotplate stirrer)
- 2.21 เครื่องเหวี่ยงสารตกลงขนาดเล็ก (mini centrifuge)
- 2.22 ตัวคูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 0.2-2 ไมโครลิตร (pipettes P2)
- 2.23 ตัวคูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 2-20 ไมโครลิตร (pipettes P20)
- 2.24 ตัวคูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 20-200 ไมโครลิตร (pipettes P200)
- 2.25 ตัวคูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 200-1,000 ไมโครลิตร (pipettes P1000)
- 2.26 ทิปสำหรับคูดจ่ายสาร (tip)
- 2.27 หลอดไมโครเซนติฟิวช์ 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 เอธิดีเดียม บอร์ไมด์ (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 และ 100 เบส

### 3. พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับ ได้แก่

3.1 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีจำนวนเมล็ดต่อร่วงประมาณ 207 เมล็ด

3.2 ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 มีจำนวนเมล็ดต่อร่วงประมาณ 133 เมล็ด

พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ ได้แก่

3.3 ข้าวเจ้าพันธุ์เมืองไทร มีจำนวนเมล็ดต่อร่วงประมาณ 338 เมล็ด

3.4 ข้าวเจ้าพันธุ์แปดริ้ว มีจำนวนเมล็ดต่อร่วงประมาณ 266 เมล็ด

**การทดลองที่ 1 การคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ (donor parent) ที่มีจำนวนเมล็ดต่อร่วงมาก เพื่อใช้สร้าง  
กลุ่มประชากรตัวอย่างสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ<sup>ยึดติดกับยีน</sup> *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ด  
ต่อร่วงกับจำนวนเมล็ดต่อร่วงในประชากรตัวอย่างที่สร้างขึ้น**

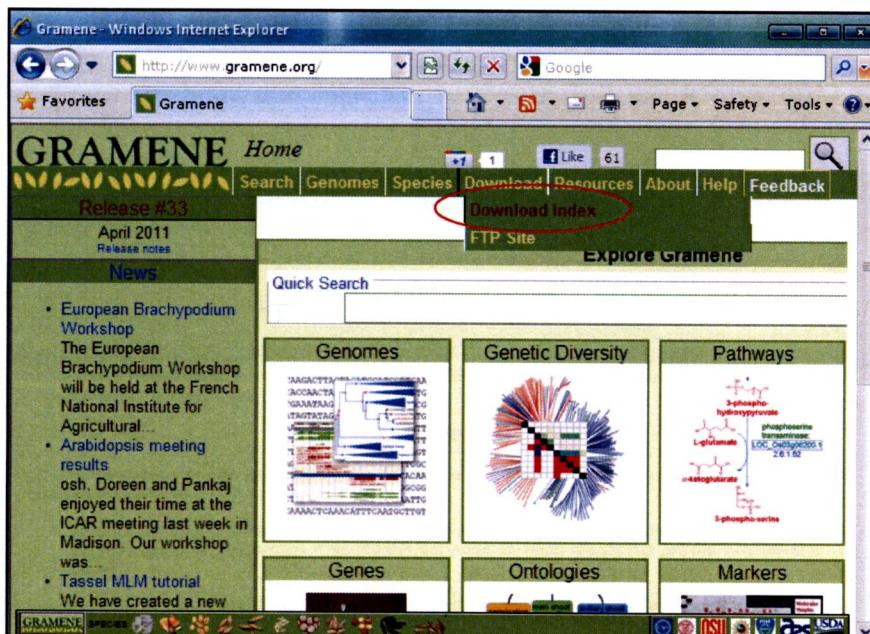
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วงกับจำนวนเมล็ดต่อร่วงในกลุ่มประชากรตัวอย่าง เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโนเมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวมีเมล็ดต่อร่วงมาก จึงจำเป็นต้องคัดเลือกข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้เพื่อสร้างประชากรตัวอย่างสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าว คัดเลือกข้าวพันธุ์รับ ได้แก่ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อร่วงเท่ากับ 207 เมล็ด และข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 มีจำนวนเมล็ดต่อร่วง 133 เมล็ด เนื่องจากเป็นข้าวที่เกณฑ์ Gronin ปีกุก และคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ (donor parent) ที่มีลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วงมาก เพื่อให้ยืนคงควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อร่วงมาก จากรายงานพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีจำนวนเมล็ดต่อร่วงมาก (วรรณณ์, 2551) ซึ่งได้รวบรวม และศึกษาข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีจำนวนเมล็ดต่อร่วงมาก และข้าวพันธุ์ต่างๆ ทั้งหมด 43 พันธุ์ พบว่าพันธุ์ข้าวที่สามารถใช้เป็นพันธุ์ให้ได้ ได้แก่ พันธุ์เมืองไทร พันธุ์แปดริ้ว และพันธุ์เม็ดมะเขือ ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อร่วงเฉลี่ยสูงถึง 338 266 และ 264 เมล็ด ตามลำดับ แล้วทำการคัดเลือกเพื่อสร้างคู่ผสมกับข้าวพันธุ์รับทั้งสองพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 กับข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 โดยพิจารณาจากข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อร่วง ประกอบกับลักษณะความสูง และอายุวันออกดอก



การทดลองที่ 2 การหา และคัดเลือกเครื่องหมายโนมเลกุลเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกันยืน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง

ในการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโนมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกันยืน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ซึ่งควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงนั้น สามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูลข้าวในเว็บไซต์ Gramene (<http://www.gramene.org/markers/microsat/>) ซึ่งได้รวบรวมเครื่องหมายโนมเลกุลชนิด SSR ที่ตำแหน่งต่างๆ บนโครโมโซมของข้าวในตาราง supplementary table 18 ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จาก IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project [IRGSP], 2005) สามารถดาวน์โหลดตาราง supplementary table 18 จากเว็บไซต์ได้ดังนี้

- 1.1 เข้าเว็บไซต์ Gramene ที่ <http://www.gramene.org/>
- 1.2 เลือกแถบ download จากนั้นเลือก download index



- 1.3 หน้าต่างจะปรากฏหัวข้อ downloads เลือก microsatellites

**GRAMENE Download**

Downloads

- FPC Physical Map (AGI)
- Genetic Maps
- In Silico Data
- Microsatellites**
- Databases as tab-separated-value files
- MySQL database dumps (insert statements)
- Protein Data
- RiceGenes Database (Archived Copy, October 2000)
- FASTA Files for building BLAST

**Software**

- Script to search for simple sequence repeats in FASTA-formatted DNA sequences -by S Cartinhour
- Gramene Web Site and supporting code (live version)
- Gramene Subversion repository

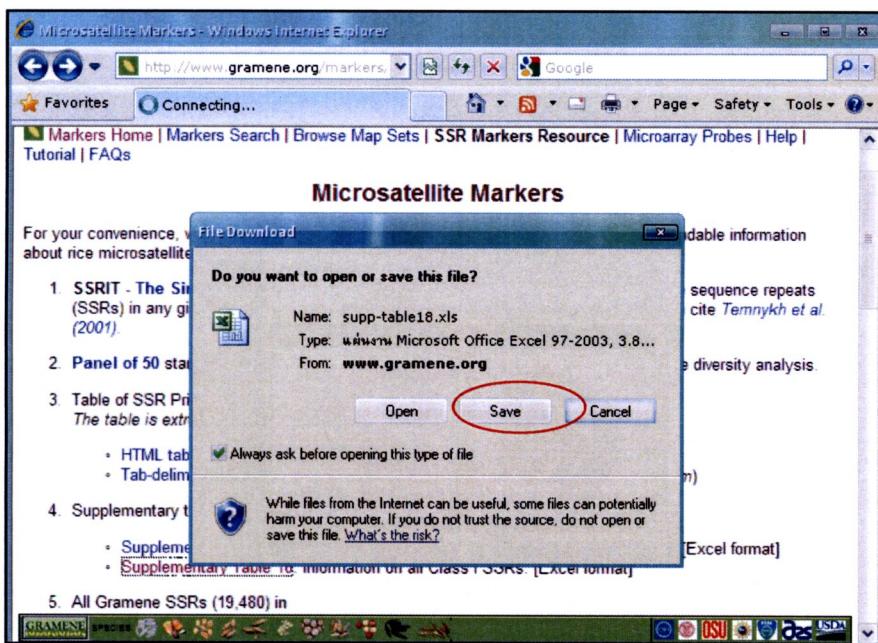
1.4 เมื่อหน้าต่างปรากฏ microsatellite markers จากนั้นเลือก supplementary table 18 ซึ่งจะแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ และรายละเอียดต่างๆ ของเครื่องหมายไมเลกุลชนิด SSR เมื่อเลือกแล้วจะปรากฏหน้าต่าง file download จากนั้นกด save เพื่อบันทึกตารางดังกล่าว

**GRAMENE Home**

**Microsatellite Markers**

For your convenience, we have listed below some useful hyperlinks to references and downloadable information about rice microsatellite (SSR) markers.

- SSRIT - The Simple Sequence Repeat Identification Tool identifies perfect simple sequence repeats (SSRs) in any given sequence(s). If you find this tool useful, we kindly request that you cite [Temnykh et al. \(2001\)](#).
- Panel of 50 standard SSR markers used by the Generation Challenge Program for rice diversity analysis.
- Table of SSR Primers from McCouch et al. (2002)  
*The table is extremely large. Please be patient while it loads.*
  - HTML table
  - Tab-delimited (save to your local hard drive and open with a spreadsheet program)
- Supplementary tables from IRGSP (2005) publication:
  - Supplementary Table 17: Location of Class I SSRs relative to genetic markers. [Excel format]
  - Supplementary Table 18: Information on all Class I SSRs. [Excel format]



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

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

## 2.1 การหาเครื่องหมายโนมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*

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

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

The screenshot shows the Gramene website interface. At the top, there's a navigation bar with links for Search, Genomes, Species, Download, Resources, About, Help, and Feedback. A sidebar on the left contains news items about the European Brachypodium Workshop, Arabidopsis meeting results, and a Tassel MLM tutorial. The main content area has a 'Quick Search' bar with 'OsCKX2' typed in. Below it are several boxes: 'Genomes' showing a DNA sequence snippet; 'Genetic Diversity' showing a circular phylogenetic tree; 'Pathways' showing a metabolic pathway diagram; 'Genes' showing a small bar chart; 'Ontologies' showing a small diagram; and 'Markers' showing a small diagram.

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

The screenshot shows the Gramene Quick Search results for 'OsCKX2'. The search bar at the top has 'OsCKX2' in it. Below the search bar, there are filters for 'In -All-' and 'Taxonomy'. The results are categorized into 'Quick Search Results (7)': 'Genomes (2)', 'Genes (1)', and 'Literature (2)'. The 'Genes (1)' section is expanded, showing 'Curated genes (1)' and 'Module Search'. Under 'Curated genes (1)', there is a list with one item: 'Oryza sativa gene "ckx2" (GR:0020051): Cytokinin oxidase/dehydrogenase 2'. This item is circled in red. Below the list, it says 'Gene: 1 to 1 of 1.'

2.1.3 เลือก sequence (5) ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน และลำดับเบสของดีเอ็นเอ จากนั้นเลือก LOC\_Os01g10110

**Curator Comment**

ccks2 is preferentially expressed in inflorescence meristems, flowers, leaves and culms. The expression of ccks2 is higher in Koshihikara than it is in other cultivars such as Habataki, NIL-Gn1a and 5150; this higher level of expression is correlated with a 21% increase in grain number. ccks2 is known to play a role in regulating cytokinin levels in the vascular system of developing culms.

**Sequences (5)**

<b>Protein</b>	Gramene Protein: Q4ADV8
<b>Nucleotide (DNA)</b>	GenBank Nucleotide: AB205193, AP003200 Rice Ensembl Gene: <b>LOC_Os01g10110</b> (circled) IRGSP Gene: Oso1g0197608

Gene-To-Gene Interactions (0)  
Gene Interactions (0)

**Map Positions (2)**  
**Gene Map Positions (1)**

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

**Gene-based displays**

- Gene summary (selected)
- Splice variants (1)
- Supporting evidence
- Sequence
- External references
- Regulation
- Expression
- Literature

**Plant Comparisons**

- Genomic alignments
- Gene Tree (image)
- Gene Tree (text)
- Gene Tree (alignment)
- Orthologues (29)
- Paralogues (10)
- Protein families

**Pan-taxonomic Comparisons**

- Gene Tree (image)
- Gene Tree (text)

**Description**: cytosolic dehydrogenase precursor, putative, expressed

**Location**: Chromosome 1: 5,269,103-5,274,678 reverse strand. (circled)

**Transcripts**: There is 1 transcript in this gene

Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	BioType
LOC_Os01g10110.1	LOC_Os01g10110.1	2586	LOC_Os01g10110.1	565	Protein_coding

**Transcript and Gene level displays**

In Ensembl Plants we provide displays at two levels:

- Transcript views which provide information specific to an individual transcript such as the cDNA and CDS domain annotation
- Gene views which provide displays for data associated at the gene level such as orthologues, paralogues, ...

2.1.5 เปิดตาราง supplementary table 18 ด้วยโปรแกรม excel แล้วหา ตำแหน่งเบสของยีน *Gn1a* คือที่ตำแหน่ง 5,269,103-5,274,678 โดยเดี๋ยวก่อนที่ใกล้เคียงมากที่สุด ซึ่งจากตารางยีน *Gn1a* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM10315 (เบสตำแหน่งที่ 5,243,215-5,243,274) และ RM10316 (เบสตำแหน่งที่ 5,286,497-5,286,516) จากนั้นแทรกแควระหว่าง RM10315 และ RM10316 ทำແນບສີໃນบริเวณตั้งกล่าว 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	TGGCATACTCGCTGGTAGTCC	CAGAGGTGGAGGTGTCAGTCG	366	5,232,170	5,232,189
RM3360	ACTTACACAAGGCCGGAAAGG	TGGTAGTGTAACTCTACTCCGATGG	171	5,236,487	5,236,516
RM10314	CATGCATACTTGTGCTTGTCC	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	AAGATCGCTGGGAGATCTGAGG	GCATGCTAATTAGTCAGCCTTG	149	5,286,497	5,286,516
RM10318	TGTCTCACACATTGACACTTACC	GGCTCTAACCCACACATGTCC	188	5,359,033	5,359,052
RM10319	TCTAACACAGAACTCCGAAAGATCC	CGATCAGGAGCGTTACATATTGG	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	AGCGGGGCATACAGTCTTCTCC	TCATGGCGTGTGGCACTAGC	278	5,368,282	5,368,307
RM10327	ACTTCTGTTGCCCCTGACAGG	GAGAGGTCGTCGAGGAACAGC	329	5,442,070	5,442,090

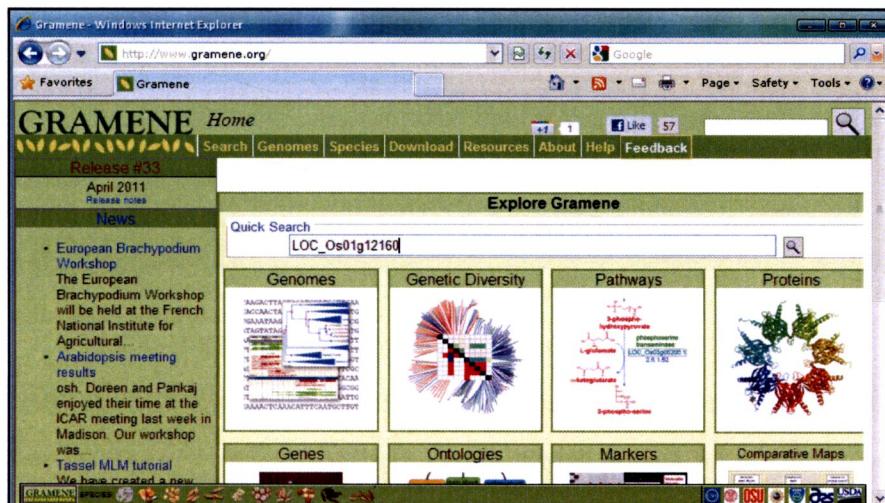
2.1.6 เปรียบเทียบจำนวนเบสของเครื่องหมายโมเลกุล SSR แต่ละตัวที่อยู่ใกล้กับยีน *Gn1a* เพื่อหา target linked marker ซึ่งมีระยะจากทั้งสองข้างของยีน *Gn1a* ได้ถึง 95,000 เบส แล้วทำการสัญลักษณ์ด้วยແບນສີ

2.1.7 กัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker โดยกัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงไว้ในตาราง แล้วสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมดจากบริษัท แปซิฟิก ไซเอ็นซ์ จำกัด

## 2.2 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือ远离 กับยีน *SPP1*

การหา และกัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือ远离 กับยีน *SPP1* จากตาราง supplementary table 18 มีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 ค้นหาตำแหน่งของยีน *SPP1* ซึ่งจากการตรวจสอบสารพนวจว่าบนรีเวน 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

Gramene Quick Search for "LOC\_Os01g12160" - Windows Internet Explorer  
 http://www.gramene.org/db/searches/quick\_search?search\_text=LOC\_Os01g12160

Find LOC\_Os01g12160 In -All- Taxonomy

E.g. IR64, +blight +resistance, fl1 in "Oryza", "flower organ" in rice, Avena QTLs related to biotic stress, or view Help.

**Quick Search Results (3)**

- Genomes (0)**
- Literature (0)**
- Markers (1)**
  - Gramene markers (1)
  - Module Search

Marker: 1 to 1 of 1.

Oryza sativa Japonica Group Gene Prediction LOC\_Os01g12160  
 LOC\_Os01g12160 LOC\_Os01g12160 LOC\_Os01g12160

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

Gramene Quick Search for "LOC\_Os01g12160" - Windows Internet Explorer  
 http://www.gramene.org/db/markers/marker\_view?marker\_id=LOC\_Os01g12160

**Map Positions (3)**

**Oryza sativa Japonica Group (3)**

Map Type	Map Set	Name	Map	Position	Ext. Links
Sequence	Gramene Annotated Nipponbare Sequence 2006	LOC_Os01g12160	Chr 1	6,621,765-6,627,264 (+) bp	
		LOC_Os01g12160	Chr 1	6,622,842-6,627,264 (-) bp	
	Gramene Annotated Nipponbare Sequence 2009	LOC_Os01g12160	Chr 1	6,623,963-6,629,463 (+) bp	<a href="#">View in Genome Browser</a>

**Associations (6)**

Associated Ontologies (0)

Imagene (0)

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) จากนั้นแทรคแคลวะห่วง RM10393 และ RM10394 ทำແນບສີໃນบริเวณดังกล่าว 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	GCAACGTTACGTCTGGCATGG	CCTCTCGCGTCTCTCAACG	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	TAGCTACGCGCGTTCTCATAGC	285	6,600,019	6,600,054
SPP1				6,623,963	6,629,463
RM10394	CAGCAGCAGCGAGATAACAGC	GTCGCTCTTGCTCTGTTCTGG	176	6,629,276	6,629,295
RM10395	GCAAGATTCAAGTCAGGTTGC	ATGTGCCCTTCGTTGACTCC	289	6,639,665	6,639,712
RM10396	TTTGCAAGGTGGACAGGAATGG	AATAGCAGCTTGCTTGGATGTGC	289	6,639,789	6,639,840
RM10397	ATGTCGAGCGGTGGTTGATAGTCG	ACCGTGATTGGTTGTTTCAGC	320	6,646,567	6,646,604
RM10398	TCTCTTGCTTAAGTGCCTTGG	TTCTGCAACTTGCAGAACAGCC	137	6,672,572	6,672,613
RM10399	NA	NA	NA	6,673,738	6,673,779
RM10400	CTCTCTCTGTGGTAAACTCTCC	ATATAGAGGTGCCTTGTGAAGG	482	6,673,948	6,673,997
RM10401	ACACACTCACACCCATCCATCC	TGATCTGCACACTGCAAACACC	277	6,676,165	6,676,190
RM10402	TGGATTGAAGGGAGCTACACC	TTGCTCCACACGATCTACACAGC	287	6,692,293	6,692,330
RM10403	CATATACATCACAGCGCTGTAGG	AGCGAGATGGAAGGCAAGAGC	407	6,703,333	6,703,364
RM10404	CTGGAGTGGTTCTCCTCTGC	TACTCTGCTCGCGTAACCTCC	312	6,709,630	6,709,653

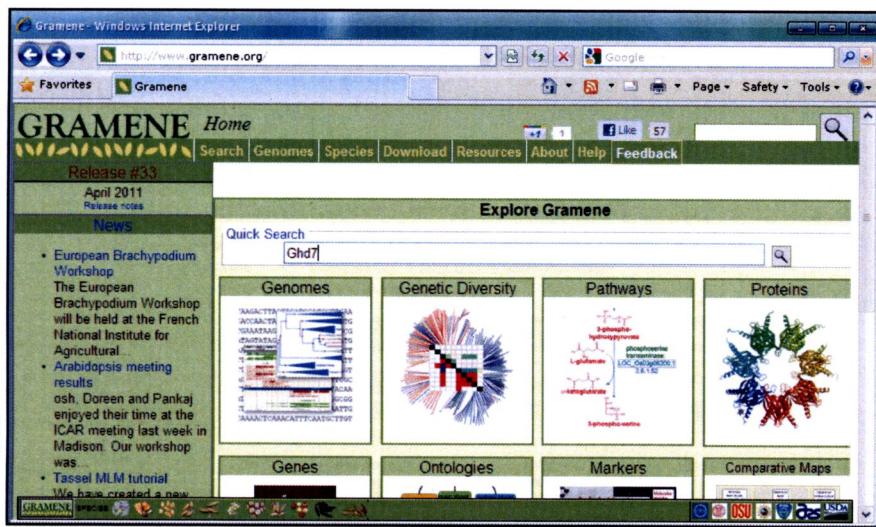
2.2.5 เปรียบเทียบจำนวนเบสของเครื่องหมายโมเลกุล SSR แต่ละตัวที่อยู่ใกล้กับยีน *SPP1* เพื่อหา target linked marker ซึ่งมีระยะจากทั้งสองข้างของยีน *SPP1* ได้ถึง 95,000 เบส แล้วทำสัญลักษณ์ด้วยແນບສີ

2.2.6 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker โดยคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงไว้ในตาราง แล้วสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมดจากบริษัท แบปซิฟิก ไซเอ็นซ์ จำกัด

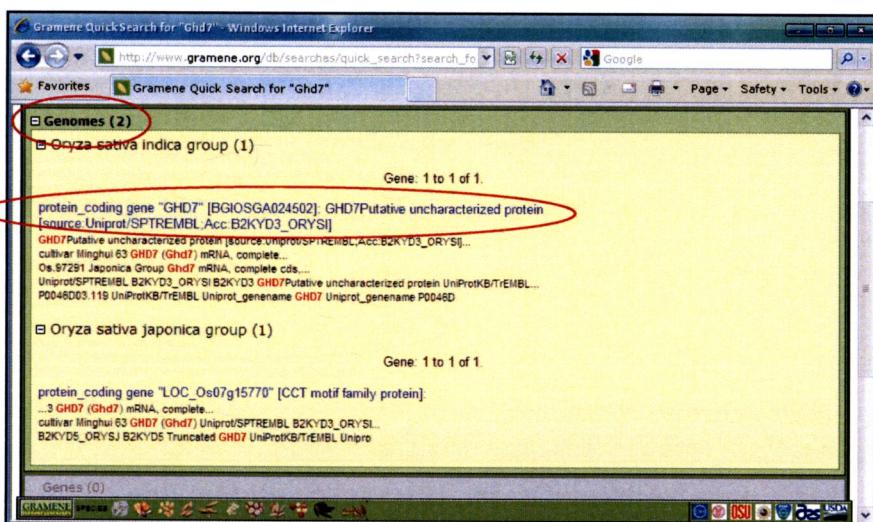
### 2.3 การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7*

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* และเลือก Genome (2) ซึ่งยีน *Ghd7* นี้มีการศึกษาทั้งในข้าวอินดิกา และข้าวปอนิกา 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* ในข้าวอินดิกานั้นตั้งอยู่บนโครโนมที่ 7 ตำแหน่งเบสที่ 9,172,628-9,175,046

Gene-based displays

- Gene summary
- Splice variants (1)
- Supporting evidence
- Sequence
- External references
- Regulation
- Expression
- Literature
- Plant Compara
  - Genomic alignments
  - Gene Tree (image)
    - Gene Tree (text)
    - Gene Tree (alignment)
  - Orthologues (16)
  - Paralogues (9)
  - Protein families
- Pan-taxonomic Compara
  - Gene Tree (image)
    - Gene Tree (text)

Description: GHD7Putative uncharacterized protein [source:Uniprot/SPTREMBL\_B2KYD3\_ORYSJ]

Location: Chromosome 7, 9,172,628-9,175,046 reverse strand

Transcripts: There is 1 transcript in this gene.

Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype
GHD7	BGIOSGA024502_TA	774	BGIOSGA024502_PA	257	Protein coding

**Transcript and Gene level displays**

In Ensembl Plants we provide displays at two levels

- Transcript views which provide information specific to an individual transcript such as the cDNA and CDS sequences and protein domain annotation.
- Gene views which provide displays for data associated at the gene level such as orthologues, paralogues, regulatory regions and splice variants.

2.3.4 จากนั้นขอนกลับไปที่หน้าแสดงผลการค้นหา แล้วทำการเลือก protein\_coding gene "LOC\_Os07g15770" [CCT motif family protein]: เพื่อดูรายละเอียดของ ตำแหน่งของยีน *Ghd7* ในข้าว japonica

Genomes (2)

Oryza sativa indica group (1)

Gene: 1 to 1 of 1.

protein\_coding gene "GHD7" [BGIOSGA024502] GHD7Putative uncharacterized protein [source:Uniprot/SPTREMBL\_Acc:B2KYD3\_ORYSJ]

GHD7Putative uncharacterized protein [source:Uniprot/SPTREMBL\_Acc:B2KYD3\_ORYSJ...]

cultivar Minghui 63 **Ghd7** (Ghd7) mRNA, complete...

Os\_97291 Japonica Group **Ghd7** mRNA, complete cds...

Uniprot/SPTREMBL\_B2KYD3\_ORYSJ B2KYD3\_GHD7Putative uncharacterized protein UnProtKB/TriEMBL... P0046D03.119 UniProtKB/TriEMBL Uniprot\_genename **Ghd7** Uniprot\_genename P0046D03.119

Oryza sativa japonica group (1)

Gene: 1 to 1 of 1.

protein\_coding gene "LOC\_Os07g15770" [CCT motif family protein]

3 **Ghd7** (Ghd7) mRNA, complete...

cultivar Minghui 63 **Ghd7** (Ghd7) Uniprot/SPTREMBL\_B2KYD5\_ORYSJ...

B2KYD5\_ORYSJ B2KYD5 Truncated **Ghd7** UniProtKB/TriEMBL Uniprot

Genes (0)

2.3.5 ปรากฏหน้าต่างที่แสดงรายละเอียดของยีน *Ghd7* ในข้าว japonica ซึ่ง แสดงตำแหน่ง และลำดับเบสของยีน โดยยีน *Ghd7* ในข้าว japonica นี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 ตำแหน่งเบสที่ 9,151,408-9,154,191

The screenshot shows the Gramene website interface for the gene LOC\_Os07g15770. The main panel displays the gene's description as 'CCT motif family protein' and its location as 'Chromosome 7: 9,151,408-9,154,191 reverse strand'. A red circle highlights the location information. Below this, it says 'Transcripts: There is 1 transcript in this gene'. A table follows, showing one transcript entry: Name: LOC\_Os07g15770.1, Transcript ID: LOC\_Os07g15770.1, Length (bp): 864, Protein ID: LOC\_Os07g15770.1, Length (aa): 287, and Biotype: Protein coding. A tooltip window titled 'Transcript and Gene level displays' provides information about the two levels of display available.

2.3.6 เปิดตาราง supplementary table 18 ด้วยโปรแกรม excel แล้วหาตำแหน่งของยีน *Ghd7* ที่ครอบคลุมบริเวณที่เป็นยีนทั้งในข้าวอินดิกา และข้าวaponica 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) จากนั้นแทรกແຕาะระหว่าง RM21336 และ RM21337 ทำແຄบสีในบริเวณดังกล่าว 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	CTCATGCTTCAGTCATTCACTGC	TCTGGATTATGGTGTCTTAGC	269	8,910,448	8,910,503
RM21331	ATATGGTCATTGGCTGGAAAGAGG	CACCATTTCTCGGGTAGGC	147	8,996,056	8,996,083
RM21332	CAAGAACACGCTGACACCATAAGC	GGCTACCTCGACTACGGCAACC	186	9,036,131	9,036,150
RM21333	ATTCCAACGGTCAGTTCAAGGG	CACGCAGTGTTGTGGTAAGC	281	9,043,958	9,044,009
RM21334	GAATTGGCGGGCAGCTTATTCC	TGTGTTCACACTCATCACACCTCTCC	356	9,071,275	9,071,310
RM5436	CAAAGGGGGTGTCTCTATG	GTTGCTCGTCCACTACATGTGC	NA	9,074,712	9,074,872
RM21335	TGAGCTGACAAGACAGACAAGC	ACCATTGAACAGGATGGACTGG	194	9,107,916	9,107,949
RM21336	GTGCTTGATATAACCTATA	AGATCAACCTTCTATTCA	NA	9,151,105	9,151,271
<b>Ghd7</b>				<b>9,151,408</b>	<b>9,175,046</b>
RM21337	NA	NA	NA	9,184,423	9,184,462
RM21338	NA	NA	NA	9,184,484	9,184,503
RM21339	CAGCTAGTAGGGTTGTGAAATGC	GACCAAATCCATCCCACAGATCG	196	9,187,154	9,187,174
RM21340	GGGAGAGCGAGAGCAAGAGAACG	TGTTGTCAGTCCTCATGCCAATCC	289	9,275,340	9,275,359
RM21342	CTCCTGGTCGCAAGAAGAAGG	CAAACACAGCATCAGCATCACC	334	9,427,766	9,427,786
RM21344	GGATGTGTTCTAACCCGTCAGG	CGAACTAACAGACTACCCATACCC	326	9,490,111	9,490,134
RM21345	GCATGCTAACGCTGAGAAGTTAGTGG	GCTACATGTCACCGATCAGACC	389	9,522,000	9,522,029
RM21347	NA	NA	NA	9,538,686	9,538,735

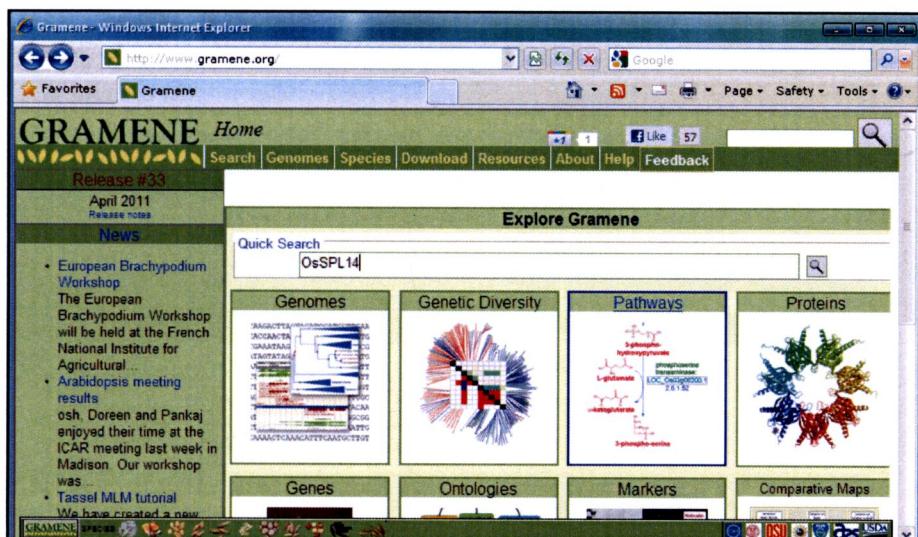
2.3.7 เปรียบเทียบจำนวนเบสของเครื่องหมายไม่เลกุล SSR แต่ละตัวที่อยู่ใกล้กับยีน *Ghd7* เพื่อหา target linked marker ซึ่งมีระยะจากทั้งสองข้างของยีน *Ghd7* ได้ถึง 95,000 เบส แล้วทำสัญลักษณ์ด้วยແຄบสี

2.3.8 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker โดยคัดเลือก เอกพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลำดับเบนของไพรเมอร์แสดงไว้ในตาราง แล้วสั่งเคราะห์ไพรเมอร์ ทั้งหมดจากบริษัท แปซิฟิก 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 จากเว็บไซด์ Gramene ซึ่งมีรายงานว่าเป็นยีนที่แปรรหัสได้โปรตีน 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]:

Find: OsSPL14 In: All Taxonomy:

E.g. IR64 +blight +resistance, flt in "Oryza", "flower organ" in rice, Avena QTLs related to biotic stress, or view Help.

**Quick Search Results (1)**

- Genomes (1)
  - Oryza sativa japonica group (1)
    - Gene: 1 to 1 of 1.
    - protein\_coding gene "LOC\_Os08g39890" [OsSPL14 - SBP-box gene family member, expressed]
    - LOC\_Os08g39890.1 TIGR\_LOCUS LOC\_Os08g39890 OsSPL14 - SBP-box gen...  
s TIGR\_LOCUS\_MODEL LOC\_Os08g39890.1 OsSPL14 - SBP-box gene family m

Genes (0)

2.4.3 ปราภกูหน้าต่างที่แสดงรายละเอียดของยีน *OsSPL14* รวมถึงตำแหน่ง และลำดับเบสของยีน โดยยีน *OsSPL14* หรือยีน *WFP* นั้นตั้งอยู่บนโครโนโซมที่ 8 ตำแหน่งเบสที่ 25,271,735-25,275,982

Gene-based displays

- Gene summary
- Splice variants (1)
- Supporting evidence
- Sequence
- External references
- Regulation
- Expression
- Literature

Plant Comparisons

- Genomic alignments
- Gene Tree (image)
- Gene Tree (text)
- Gene Tree (alignment)
- Orthologues (7)
- Paralogues (10)
- Protein families
- Pan-taxonomic Comparisons
- Gene Tree (image)

Location: 8:25,271,735-25,275,982 Gene: LOC\_Os08g39890 Trans: LOC\_Os08g39890.1

**Gene: LOC\_Os08g39890**

Description: OsSPL14 - SBP-box gene family member, expressed

Location: Chromosome 8: 25,271,735-25,275,982 reverse strand

Transcripts: There is 1 transcript in this gene

Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype
LOC_Os08g39890.1	LOC_Os08g39890.1	1716	LOC_Os08g39890.1	417	Protein coding

**Transcript and Gene level displays**

In Ensembl Plants we provide displays at two levels:

- Transcript views which provide information specific to an individual transcript such as the cDNA and CDS sequences and protein domain annotation.
- Gene views which provide displays for data associated at the gene level such as...

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) จากนั้นแทรกและวัดว่า RM23425 และ RM23426 ทำແฉบส์ในบริเวณดังกล่าว 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	ACCTGAGCTCGATGGTTTCC	GCTCCCACCAAGTATTCTATCG	263	25,222,439	25,222,522
RM23420	GATGGGACATTCAATTCACTCG	GACTGTGCAGGAGTAGCAGTAGTACG	371	25,232,869	25,232,888
RM23421	ATGGACATGTGGTTAACATCG	TGCCAAGTAAGGACATACTCTACTCC	234	25,246,335	25,246,372
RM23422	GTCGGTCAAGAAGTTACAGATCC	TCAGGCAAATGTAAGGATGGTAGC	186	25,246,687	25,246,706
RM23423	CGGGCGATAGTTAAAGAACATCG	GCAGGTTACCGCAATAGCATCC	191	25,256,213	25,256,232
RM23424	NA	NA	NA	25,257,284	25,257,311
RM23425	TGGCGGCAGTAGTAGTTGATCC	GCCGTCCTCGTCTTCCAAGG	168	25,271,025	25,271,045
<b>WFP</b>				<b>25,271,735</b>	<b>25,275,982</b>
RM23426	CATCATTCGCGGTAGAACATCG	AGAGGTACAGTGGCACGATCAGG	131	25,320,052	25,320,072
RM23427	AGGGAGTCGGAGACCATGACG	TACCGCGTATCATGTCCTGACG	150	25,333,966	25,333,986
RM23428	ACAGTACTAGCACAGCTGAAGGAAGG	GCAGCGATAACCACATTCCTGC	85	25,344,812	25,344,832
RM23429	CGGGCAGGTAGAAGGTGACG	CAGTGATTGTGACAGTGTGAGAGG	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	GCCTTGAGGATAAGAACACAGG	GAGGGTGGTAGATTGCAATTGG	174	25,373,578	25,373,598
RM23433	CTGCAACACAGTAACCTAGATCG	CCAAGAACGAAAGAACAAACC	262	25,373,795	25,373,838
RM23434	GGAAATCCGGTACCCAGGAGG	TCTCCTCTAACGGATCCAAAAGACC	102	25,394,421	25,394,452
RM23435	CACGTTACATAGCTCACCATACAGC	GTAACGTTGTCAGCCCTGTGTC	397	25,407,113	25,407,132
RM23436	TGAGTCACCGTGCACCATCTCC	GTGGTGGTGCAGAACACTGTAGG	170	25,474,448	25,474,467

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

2.4.6 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker โดยคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงไว้ในตาราง แล้วสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมดจากบริษัท แปซิฟิก ไซเอ็นซ์ จำกัด

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง และคัดเลือกเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 และชั้นนาท 1 กับพันธุ์ให้พันธุ์แบบริว์ และเมืองไทรได้สำเร็จ

เมื่อทำการคัดเลือกได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น target linked marker ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แต่ละยีน แล้วทำการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละเครื่องหมาย เพื่อตรวจสอบว่าเครื่องหมายโมเลกุลได้สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับ กข 6 และชั้นนาท 1 กับพันธุ์ให้พันธุ์แบบริว์ และเมืองไทรได้ ด้วยขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

### 3.1 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้กับข้าวพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้คือ พันธุ์แปดริ้ว

3.1.1 เมื่อต้นข้าวพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว มีอายุ 15 วัน นำไปข้าวแต่ละต้นมาสักดีอีนเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างของจีโนไทประห่วงข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ โดยใช้ชุดสักดีอีนเอสำเร็จรูป genomic DNA purification kit ของบริษัท Fermentas

3.1.2 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีอีนเอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีดีอีนเอของข้าวพันธุ์ กข 6 พันธุ์แปดริ้ว และดีอีนเอผสมของข้าวพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์แปดริ้วซึ่งใช้แทนตัวอย่าง F<sub>1</sub> ของคู่ผสมดังกล่าวเป็นแม่พิมพ์ โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 1.5 μl สารละลายน้ำ 2x Promega's PCR green master mix (ประกอบด้วย 400 μM dNTPs reaction buffer (pH 9) 3 mM MgCl<sub>2</sub> และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.1 units/μl) ปริมาตร 7.5 μl สารละลายน้ำมอร์ชันดิ forward และ reverse ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยืดติดกันยืน Gn1a, SPP1, Ghd7 และ WFP แต่ละเครื่องหมายที่ความเข้มข้น 3 μM ปริมาตร 2 μl และดีอีนเอแม่พิมพ์ (DNA template) ปริมาตร 2 μl รวมปริมาตรทั้งหมด เท่ากับ 15 μl เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีอีนเอด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น PCT-100 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอน predenaturing แล้วเริ่มต้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีอีนเอในรอบที่ 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 เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีอีนเอ และระหว่าง final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รวมระยะเวลาการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที

3.1.3 วิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีอีนเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซ (electrophoresis) โดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะgarose (agarose) ที่ความเข้มข้น 4% ในสารละลายน้ำ TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นย้อมชิ้นส่วนดีอีนเอด้วยสารละลายนีโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 10 นาที ถังสีข้อมส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc 2000 (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟต์แวร์ Quantity One (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

3.1.4 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ขนาดของແນບดีอีนเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว ในกรณีที่ไม่พบเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ขนาดของແນບดีอีนเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ ต้องทำการหา และคัดเลือกเครื่องหมาย

โมเลกุลที่อยู่ไก่กับบินจากตาราง supplementary table 18 เพิ่ม แล้วทำการตรวจสอบด้วยวิธีการดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

### 3.2 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้กับข้าวพันธุ์รับขัยนาท 1 และพันธุ์ใหม่ กือ พันธุ์เมืองไทย

3.2.1 เมื่อต้นข้าวพันธุ์รับขัยนาท 1 และพันธุ์ใหม่เมืองไทย มีอายุ 15 วัน นำใบข้าวแต่ละต้นมาสักดีเย็นแอเพิ่มตรวจสอบความแตกต่างของจีโนไทประห่วงข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ใหม่ โดยใช้ชุดสักดีเย็นแอสำเร็จรูป genomic DNA purification kit ของบริษัท Fermentas

3.2.2 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเย็นแอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีดีเย็นแอของข้าวพันธุ์รับขัยนาท 1 พันธุ์เมืองไทย และดีเย็นแอผสมของข้าวพันธุ์รับขัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์เมืองไทยซึ่งใช้แทนตัวอย่าง  $F_1$  ของคู่ผสมดังกล่าวเป็นแม่พิมพ์ โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำกัลล์ปริมาตร  $1.5 \mu\text{l}$  สารละลายน้ำ  $2x$  Promega's PCR green master mix (ประกอบด้วย  $400 \mu\text{M}$  dNTPs reaction buffer (pH 9)  $3 \text{ mM MgCl}_2$  และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase  $0.1 \text{ units}/\mu\text{l}$ ) ปริมาตร  $7.5 \mu\text{l}$  สารละลายน้ำเมอร์ชนิด forward และ reverse ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ไก่หรือยีดดิกับบิน *Gn1a*, *SPPI*, *Ghd7* และ *WFP* แต่ละเครื่องหมายที่ความเข้มข้น  $3 \mu\text{M}$  ปริมาตร  $2 \mu\text{l}$  และดีเย็นแอแม่พิมพ์ (DNA template) ปริมาตร  $2 \mu\text{l}$  รวมปริมาตรทั้งหมด เท่ากับ  $15 \mu\text{l}$  เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเย็นแอด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น PCT-100 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอน predenaturing แล้วเริ่มต้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเย็นแอในรอบที่ 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 เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเย็นแอ และระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รวมระยะเวลาการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที

3.2.3 วิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเย็นแอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอร์ไซส์ (electrophoresis) โดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะ加โรส (agarose) ที่ความเข้มข้น  $4\%$  ในสารละลายน้ำ TBE buffer ความเข้มข้น  $1 \text{ \mu\text{g}/\text{ml}}$  เท่า โดยใช้แรร์เคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นข้อมูลชิ้นส่วนดีเย็นแอด้วยสารละลายนีดีเมียมไบรามิด (ethidium bromide) เป็นเวลา 10 นาที ล้างสีข้อมูลชิ้นส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกัลล์เป็นเวลา 5 นาที บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc 2000 (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟต์แวร์ Quantity One (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

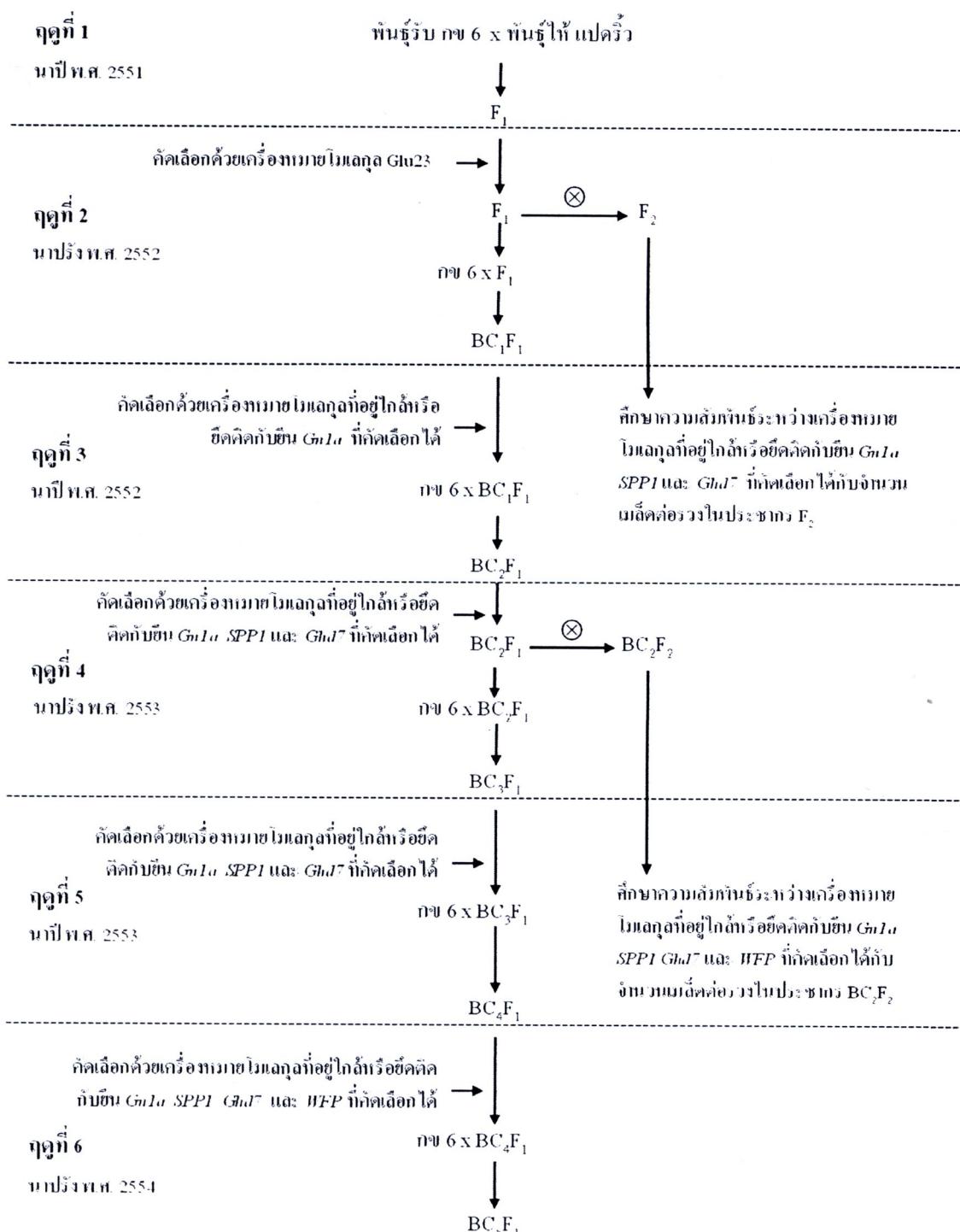
3.2.4 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ขนาดของແບບດีເອື່ນເອົາແຕກຕ່າງກັນຮະຫວ່າງຂ້າວພັນຫຼຸ້ມີຮັບຂໍ້າພາກ 1 ກັບພັນຫຼຸ້ໃຫ້ເມືອງໄທ ໃນການຟີ່ໄໝພົນເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລທີ່ໃຫ້ຂາດຂອງແບບດີເອື່ນເອົາແຕກຕ່າງກັນຮະຫວ່າງພັນຫຼຸ້ມີຮັບ ແລະພັນຫຼຸ້ໃຫ້ ຕ້ອງທ່າງກາຫາ ແລະ ຄັດເລືອກເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລທີ່ອູ້ໄກລ້າກັບຍືນຈາກຕາງ supplementary table 18 ເພີ່ມ ແລ້ວທ່າງກາຫາກວ່າສອນດ້ວຍວິທີການດັ່ງທີ່ໄດ້ກຳລ່າວໄປແລ້ວຂ້າງຕົ້ນ

ກາຮັດລອງທີ່ 4 ສ້າງປະກາຮົມຕ້ວອຍ່າງເພື່ອໃຊ້ໃນກາຮັດສົມພັນຫຼຸ້ຮະຫວ່າງເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລ  
ທີ່ອູ້ໄກລ້າຫຼີ້ຍືດຕິດກັບຍືນ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* ແລະ *WFP* ທີ່ກວ່າມຄຸມລັກຍະຈຳນວນແມັດຕ່ອງຮວງ  
ກັບຈຳນວນແມັດຕ່ອງຮວງ ໄດ້ແກ່ ປະກາຮົມ  $F_2$  ແລະ  $BC_2F_2$  ຂອງຄູ່ຜົມຮະຫວ່າງຂ້າວພັນຫຼຸ້  
ຮັບ ການ 6 ກັບພັນຫຼຸ້ໃຫ້ແປດົວ ປະກາຮົມ  $F_{3:4}$  ແລະ  $BC_1F_2$  ຂອງຄູ່ຜົມ  
ຮະຫວ່າງຂ້າວພັນຫຼຸ້ຮັບຂໍ້າພາກ 1 ກັບພັນຫຼຸ້ໃຫ້ເມືອງໄທ

ທ່າງການສ້າງປະກາຮົມຂອງຄູ່ຜົມຮະຫວ່າງຂ້າວພັນຫຼຸ້ຮັບ ການ 6 ກັບພັນຫຼຸ້ໃຫ້ແປດົວ ແລະ  
ຄູ່ຜົມຮະຫວ່າງຂ້າວພັນຫຼຸ້ຮັບຂໍ້າພາກ 1 ກັບພັນຫຼຸ້ໃຫ້ເມືອງໄທ ເພື່ອໃຊ້ໃນກາຮັດສົມພັນຫຼຸ້ຮະຫວ່າງ  
ເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລທີ່ອູ້ໄກລ້າຫຼີ້ຍືດຕິດກັບຍືນ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* ແລະ *WFP* ທີ່ກວ່າມຄຸມລັກຍະ  
ຈຳນວນແມັດຕ່ອງຮວງກັບຈຳນວນແມັດຕ່ອງຮວງ ຈຶ່ງໄດ້ວາງແພນກາຮັດສົມພັນຫຼຸ້ຂ້າວ ແລະສ້າງປະກາຮົມຂອງ  
ທັງສອງຄູ່ຜົມ ດັ່ງນີ້

#### 4.1 ຄູ່ຜົມຂອງຂ້າວພັນຫຼຸ້ ການ 6 ກັບພັນຫຼຸ້ແປດົວ

ວາງແພນກາຮັດສົມພັນຫຼຸ້ຂ້າວຂອງຄູ່ຜົມຮະຫວ່າງຂ້າວພັນຫຼຸ້ຮັບພັນຫຼຸ້ ການ 6 ກັບຂ້າວພັນຫຼຸ້ໃຫ້  
ພັນຫຼຸ້ແປດົວ ຈຳນວນ 6 ຄຸດ ດັ່ງການ 9 ຄຸດທີ່ 1 ທ່າງການພົນພັນຫຼຸ້ຂ້າວເໜີຍພັນຫຼຸ້ ການ 6 ມີຈຳນວນແມັດ  
ຕ່ອງຮວງເລີ່ມ 207 ເມັດຕີ ຈຶ່ງໃຫ້ເປັນພັນຫຼຸ້ຮັບ ກັບຂ້າວພັນຫຼຸ້ໃຫ້ ອື່ນ້າພັນຫຼຸ້ແປດົວທີ່ມີຈຳນວນແມັດຕ່ອງຮວງ  
ເລີ່ມ 266 ເມັດຕີ ຈຶ່ງຄັດເລືອກໄດ້ຈາກກາຮັດລອງທີ່ 1 ເພື່ອພົລິຕົມແມັດຕີ  $F_1$  ແລ້ວທ່າງການຄັດເລືອກຕົ້ນ  $F_1$  ດ້ວຍ  
ເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລ *Glu23* ຈຶ່ງໃຫ້ຕ່ວງສອບຈິໂນໄທປະຫວ່າງຂ້າວເໜີຍ ແລະຂ້າວເຈົ້າ (Wanchana *et al.*, 2003 ຊ້າງໂດຍ ເຈຕະຮັບຢັ້ງ, 2550) ໃນຄຸດທີ່ 2-6 ທ່າງການພົນກັນ 5 ຄຣັງ ແລ້ວທ່າງການຄັດເລືອກດ້ວຍ  
ເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລໃນແຕ່ລະໜ້າ ຈຶ່ງໃນຄຸດທີ່ 3 ທ່າງການຄັດເລືອກດ້ວຍເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລທີ່ອູ້ໄກລ້າຫຼີ້ຍືດ  
ຕິດກັບຍືນ *Gn1a* ເຖິງນັ້ນ ໙ີ້ອ່າງຍິ່ງໄມ່ພົນເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລທີ່ອູ້ໄກລ້າຫຼີ້ຍືດຕິດກັບຍືນ *SPP1* ແລະ  
*Ghd7* ແຕ່ໃນຄຸດທີ່ 4-5 ສາມາຮັດຫາເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລທີ່ອູ້ໄກລ້າຫຼີ້ຍືດຕິດກັບຍືນ *SPP1* ແລະ *Ghd7* ໄດ້  
ເພີ່ມເຕີມຈຶ່ງໃຫ້ຄັດເລືອກຕົ້ນ  $BC_2F_1$  ທີ່ແສດງແບບດີເອື່ນເອົາແບບເຫຼັກໂໂຫຼກ ລັງຈາກການຄັດເລືອກດ້ວຍ  
ເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລທີ່ອູ້ໄກລ້າຫຼີ້ຍືດຕິດກັບຍືນ *Gn1a* ຕາມລຳດັບ



**ภาพ 9** แสดงแผนผังการสร้างประชากร F<sub>2</sub> และ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> ของคู่สมระระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กษ 6 กับพันธุ์ให้แปดริ้ว เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายไม่เต็มที่อยู่ในกล้าหรือ ยีดติดกับยีน Gn1a, SPP1, Ghd7 และ WFP ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรังกับจำนวนเมล็ดต่อรัง

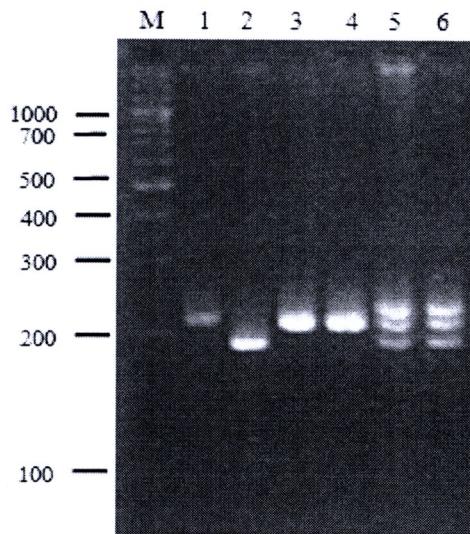
ในฤดูที่ 6 มีรายงานวิจัยของยืน WFP จึงทำการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ไกล์หรือยีดิติกับยืน WFP เพื่อใช้คัดเลือกต้น  $BC_4F_1$  ที่แสดงแทนดีเอ็นเอแบบเซทเทอโร ไซกัส หลังจากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ไกล์หรือยีดิติกับยืน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ นอกจากนี้ในฤดูที่ 2 ทำการทดสอบตัวเองของต้น  $F_1$  เพื่อผลิตเมล็ด  $F_2$  สำหรับใช้ในการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ไกล์หรือยีดิติกับยืน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 3 และในฤดูที่ 4 ได้ทำการทดสอบตัวเองของต้น  $BC_2F_1$  ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ไกล์หรือยีดิติกับยืน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร ไซกัส เพื่อผลิตเมล็ด  $BC_2F_2$  สำหรับใช้ในการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ไกล์หรือยีดิติกับยืน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5

การคัดเลือกต้น  $F_1$  และต้น  $BC_nF_1$  ของคู่สมระระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ให้แปรริ่ว โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ กข 6 ข้าวพันธุ์ แปรริ่ว  $F_1$  และ  $BC_nF_1$  โดยใช้ชุดสำหรับสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Genomic DNA Purification Kit ของบริษัท Fermentas) ดังวิธีการสกัดของบริษัท จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณชึ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 เป็นไพรเมอร์ ซึ่งให้ขนาดของແບນດีเอ็นເອແຕກຕ່າງກັນຮວ່າງข້າວພັນຫຼຸ້ນ ກຂ 6 ກັບພັນຫຼຸ້ນໃຫ້ແປຣິວ ແລ້ວตรวจผลผลิตของພຶສີອາຣີ ດ້ວຍວິທີອີເລີກໂຕຣໂພຣີຊີສ ດຳເນີນການເຫັນເຄີຍກັນວິທີທີ່ໄດ້ກຳລຳໄວ້ໄປແລ້ວຂ້າງຕົ້ນ

#### เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก ได้แก่

(1) เครื่องหมายโมเลกุล Glu23 (Wanchana *et al.*, 2003 อ้างโดย เจตศรัณย์, 2550) ซึ่งให้ขนาดของແບນດีเอ็นເອແຕກຕ່າງກັນຮວ່າງข້າວພັນຫຼຸ້ນ ກຂ 6 ซື່ງເປັນข້າວເໜີຍກັບข້າວພັນຫຼຸ້ນໃຫ້ແປຣິວ ซື່ງເປັນข້າວເຈົ້າ โดยໃນແຕ່ລະປຸງກິຈີຍຂອງການທຳພຶສີອາຣີປະກອບດ້ວຍ ສາຮລະລາຍ 2x Promega's PCR green master mix (ປະກອບດ້ວຍ 400  $\mu$ M dNTPs reaction buffer (pH 9) 3 mM MgCl<sub>2</sub> และເອນໄໝນ *Taq* DNA polymerase 0.1 units/ $\mu$ l) ປົມາຕາຣ 7.5  $\mu$ l ສາຮລະລາຍໄພຣມອ້ຣ Glu23 ชนິດ forward และ reverse ທີ່ຄວາມເໜີນຂຶ້ນ 5  $\mu$ M ປົມາຕາຣ 2  $\mu$ l ແລະ ດີເລີນເອມເມັ່ນເພີ (DNA template) ປົມາຕາຣ 3.5  $\mu$ l ຮວມປົມາຕາຣທັງໝົດ ເທົ່າກັນ 15  $\mu$ l ເພີ່ມປົມາມີ້ນສ່ວນດີເລີນເອດ້ວຍ ກේ່ຽວພຶສີອາຣີຮູ່ PCT-100 ໂດຍຕັ້ງໂປຣແກຣມການທຳງານທີ່ອຸຸນຫຼຸມ 94 ອົງຄາເໜີລເຊີຍສ ເປັນເວລາ 2 ນາທີ ໃນຂັ້ນຕອນ predenaturing ແລ້ວເວັ່ນຕົ້ນການເພີ່ມປົມາມີ້ນສ່ວນດີເລີນເອໃນຮອບທີ່ 1 ດ້ວຍຂັ້ນຕອນ denaturing ທີ່ອຸຸນຫຼຸມ 94 ອົງຄາເໜີລເຊີຍສ ເປັນເວລາ 1 ນາທີ ຂັ້ນຕອນ annealing ທີ່ອຸຸນຫຼຸມ 64 ອົງຄາເໜີລເຊີຍສ ເປັນເວລາ 1 ນາທີ 30 ວິນາທີ ແລ້ວກິຈີຍທີ່ອຸຸນຫຼຸມ 72 ອົງຄາເໜີລເຊີຍສ ເປັນເວລາ 1 ນາທີ 30 ວິນາທີ ທຳປຸງກິຈີຍທີ່ອຸຸນຫຼຸມ 35 ຮອບ ເພີ່ມປົມາມີ້ນສ່ວນດີເລີນເອ ແລະ ຮະບະ final extension

ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รวมระยะเวลาการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ทำการคัดเลือกต้น F, ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโรไซกัสที่แสดงແບນดีเอ็นเอของทั้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เป็นพันธุ์รับและข้าวเจ้าพันธุ์แปดริ้วที่เป็นพันธุ์ให้ ดังแสดงในภาพ 10



ภาพ 10 ภาพอะก้าโรสเจลแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์เมื่อใช้ Glu23 เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ สัญลักษณ์กำกับ M คือ แอบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แอบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เลนที่ 2 คือ แอบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวเจ้าพันธุ์แปดริ้ว และเลนที่ 3-6 คือ แอบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์ของต้น F<sub>1</sub> ซึ่งต้นที่คัดเลือกได้อยู่ในเลนที่ 5 และ 6 เพราะมีขนาดของแอบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์เท่ากับแอบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว

(2) เครื่องหมายโนมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่คัดเลือกได้ คือ RM10318 ซึ่งให้ขนาดของแอบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับ กข 6 และพันธุ์ให้แปดริ้ว ทำการคัดเลือกต้น BC<sub>n</sub>F<sub>1</sub> ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโรไซกัสที่แสดงແບນดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และแปดริ้ว

(3) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ในกลีบหรือเย็ดติดกับยีน *SPP1* ที่คัดเลือกได้ คือ RM10395 ซึ่งให้ขนาดของແບນດີເອັນເອແຕກຕ່າງກັນຮວ່າງພັນຫຼຸ້ນ ກຂ 6 ແລະພັນຫຼຸ້ໃຫ້ແປດວິ້ວ ทำการคัดເລືອກຕົ້ນ  $BC_nF$ , ທີ່ມີຈິໂນໄທປີແບນເສຫເຖເທໂຣໄໝກໍສທ່າແສດງແບນດີເອັນເອຂອງທັ້ງ ກຂ 6 ແລະແປດວິ້ວ

(4) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ในกลีบหรือเย็ดติดกับยีน *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ คือ RM21335 ซึ่งให้ขนาดของແບນດີເອັນເອແຕກຕ່າງກັນຮວ່າງພັນຫຼຸ້ນ ກຂ 6 ແລະພັນຫຼຸ້ໃຫ້ແປດວິ້ວ ทำการคัดເລືອກຕົ້ນ  $BC_nF$ , ທີ່ມີຈິໂນໄທປີແບນເສຫເຖເທໂຣໄໝກໍສທ່າແສດງແບນດີເອັນເອຂອງທັ້ງ ກຂ 6 ແລະແປດວິ້ວ

(5) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ในกลีบหรือเย็ดติดกับยีน *WFP* ที่คัดเลือกได้ คือ RM23428 ซึ่งให้ขนาดของແບນດີເອັນເອແຕກຕ່າງກັນຮວ່າງພັນຫຼຸ້ນ ກຂ 6 ແລະພັນຫຼຸ້ໃຫ້ແປດວິ້ວ ทำการคัดເລືອກຕົ້ນ  $BC_nF$ , ທີ່ມີຈິໂນໄທປີແບນເສຫເຖເທໂຣໄໝກໍສທ່າແສດງແບນດີເອັນເອຂອງທັ້ງ ກຂ 6 ແລະແປດວິ້ວ

วิธีการคัดເລືອກຕົ້ນ  $F_1$ , ໂດຍໃຊ້ເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລນັ້ນມີຮາຍລະເອີດ ດັ່ງຕ້ອໄປນີ້

#### 4.1.1 การคัดເລືອກຕົ້ນ $F_1$ , ໂດຍໃຊ້ເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລ

ຕົ້ນ  $F_1$ , ທີ່ໄດ້ຈາກການຜສນຮວ່າງຂ້າວພັນຫຼຸ້ ກຂ 6 ຊຶ່ງໃຊ້ເປັນພັນຫຼຸ້ນ ແລະຂ້າວພັນຫຼຸ້ໃຫ້ ອື່ນຫຼຸ້ແປດວິ້ວທີ່ກັດເລືອກໄດ້ຈາກການທົດລອງທີ່ 1 ຄູກນໍາມາກັດເລືອກໂດຍໃຊ້ເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລ *Glu23* ຊຶ່ງໃຫ້ขนาดຂອງແບນດີເອັນເອແຕກຕ່າງກັນຮວ່າງຂ້າວພັນຫຼຸ້ນ ກຂ 6 ຊຶ່ງເປັນຂ້າວເໜີຍກັບພັນຫຼຸ້ໃຫ້ພັນຫຼຸ້ ແປດວິ້ວ ຊຶ່ງເປັນຂ້າວເຈົ້າ ໂດຍກັດເລືອກຕົ້ນ  $F_1$ , ທີ່ມີຈິໂນໄທປີແບນເສຫເຖເທໂຣໄໝກໍສ ອື່ນມີຂາດຂອງແບນດີເອັນເອທ່າກັນແບນດີເອັນເອຂອງທັ້ງ ກຂ 6 ແລະແປດວິ້ວ ແສດງວ່າເປັນຕົ້ນທີ່ໄໝໄດ້ເກີດຈາກການຜສນຕົວອອງຂອງຕົ້ນ ກຂ 6 ຈາກນັ້ນນຳຕົ້ນ  $F_1$ , ທີ່ກັດເລືອກໄດ້ຜສນກລັບໄປໜ້າຂ້າວພັນຫຼຸ້ນ ກຂ 6 ເພື່ອຜລິຕເມັດ  $BC_1F_1$ , ຂໍມະເດີຍກັນທໍາການຜສນຕົວອອງຂອງຕົ້ນ  $F_1$ , ເພື່ອຜລິຕເມັດ  $F_2$  ສໍາຫັບໃຫ້ໃນການສຶກຍາຄວາມສັນພັນຫຼຸ້ອງເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລທີ່ອູ່ໃກລື້ທີ່ຍືດຕິກັນຢືນ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* ແລະ *WFP* ທີ່ຄວບຄຸມລັກມະຈຳນວນເມັດຕ່ອງຮວງກັບຈຳນວນເມັດຕ່ອງຮວງໃນຖຸດທີ່ 3

#### 4.1.2 การคัดເລືອກຕົ້ນ $BC_1F_1$ , ໂດຍໃຊ້ເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລ

ຕົ້ນ  $BC_1F_1$ , ທີ່ໄດ້ຈາກຂໍ້ 4.1.1 ຄູກນໍາມາກັດເລືອກເພື່ອໄຫ້ໄດ້ຕົ້ນທີ່ຕ້ອງການ ໂດຍໃຊ້ເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລ ອື່ນ *RM10318* ທີ່ອູ່ໃກລື້ທີ່ຍືດຕິກັນຢືນ *Gn1a* ເພີ່ງເຄື່ອງໝາຍເດີຍວາ ໙ີ້ອາງຍັງໄນ່ພວມເຄື່ອງໝາຍໂມເລກຸລທີ່ອູ່ໃກລື້ທີ່ຍືດຕິກັນຢືນ *SPP1* ແລະ *Ghd7* ການກັດເລືອກດໍາເນີນການເຫັນເດີຍກັນທີ່ໄດ້ກ່າວໄວ້ໄປແລ້ວຂ້າງຕົ້ນ ໂດຍກັດເລືອກຕົ້ນ  $BC_1F_1$ , ທີ່ມີຈິໂນໄທປີແບນເສຫເຖເທໂຣໄໝກໍສ ອື່ນມີຂາດຂອງແບນດີເອັນເອທ່າກັນແບນດີເອັນເອຂອງທັ້ງ ກຂ 6 ແລະແປດວິ້ວ ແສດງວ່າເປັນຕົ້ນທີ່ໄໝໄດ້ເກີດຈາກການຜສນຕົວອອງຂອງຕົ້ນ ກຂ 6 ແລະ ໄດ້ຮັບອັລລິລອງຢືນ *Gn1a* ທີ່ຄວບຄຸມລັກມະຈຳນວນເມັດຕ່ອງຮວງຈາກພັນຫຼຸ້ໃຫ້ແປດວິ້ວ ຈາກນັ້ນນຳຕົ້ນ  $BC_1F_1$ , ທີ່ກັດເລືອກໄດ້ຜສນກລັບໄປໜ້າຂ້າວພັນຫຼຸ້ ກຂ 6 ເພື່ອຜລິຕເມັດ  $BC_2F_1$ ,

#### 4.1.3 การคัดเลือกต้น $BC_2F_1$ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น  $BC_2F_1$  ที่ได้จากข้อ 4.1.2 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM10318 ที่อยู่ไกล์หรือยีดติดกับยีน *Gn1a* ทำการคัดเลือกต้น  $BC_2F_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโรไซกัส คือมีขนาดของແບນດີເອົ້າກັບແບນດີເອົ້າເອຂອງທັ້ງ กx 6 และແປດົວ ແສດວ່າເປັນຕົ້ນທີ່ໄມ່ໄດ້ເກີດຈາກການຜສນຕົວເອງຂອງຕົ້ນ กx 6 ແລະ ໄດ້ຮັບອັລືລືຂອງยືນ *Gn1a* ທີ່ຄວບຄຸມລັກຍະຈຳນວນເມີດຕ່ອງຮວງຈາກພັນຖີໃຫ້ແປດົວ ຈາກນັ້ນນຳຕົ້ນ  $BC_2F_1$  ທີ່ຄັດເລືອກໄດ້ການກັດເລືອກຕ່ອງດ້ວຍເຄື່ອງໝາຍ ໂມເລກຸລ RM10395 ທີ່ອູ້ໄກລ້າຫຼືອູ້ຍືດຕິດກັບຍືນ *SPP1* ໂດຍກຳນົດຕັ້ງຕົ້ນ  $BC_2F_1$  ທີ່ມີຈີໂນໄກປໍແບນເຊທເຫວໂຣໄຊກສ ຄື່ອມື່ນາດຂອງແບນດີເອົ້າເອົ້າກັບແບນດີເອົ້າເອຂອງທັ້ງ กx 6 ແລະ ແປດົວ ຜຶ່ງເປັນຕົ້ນທີ່ໄດ້ຮັບອັລືລືຂອງຍືນ *SPP1* ທີ່ຄວບຄຸມລັກຍະຈຳນວນເມີດຕ່ອງຮວງຈາກພັນຖີໃຫ້ແປດົວ ຈາກນັ້ນກຳນົດຕັ້ງຕົ້ນ  $BC_2F_1$  ທີ່ມີຈີໂນໄກປໍແບນເຊທເຫວໂຣໄຊກສ ຄື່ອມື່ນາດຂອງແບນດີເອົ້າເອົ້າກັບແບນດີເອົ້າເອຂອງທັ້ງ กx 6 ແລະ ແປດົວ ຜຶ່ງເປັນຕົ້ນທີ່ໄດ້ຮັບອັລືລືຂອງຍືນ *Ghd7* ໂດຍກັດເລືອກຕົ້ນ  $BC_2F_1$  ທີ່ມີຈີໂນໄກປໍແບນເຊທເຫວໂຣໄຊກສ ຄື່ອມື່ນາດຂອງແບນດີເອົ້າເອົ້າກັບແບນດີເອົ້າເອຂອງທັ້ງ กx 6 ແລະ ແປດົວ ຜຶ່ງເປັນຕົ້ນທີ່ໄດ້ຮັບອັລືລືຂອງຍືນ *Ghd7* ທີ່ຄວບຄຸມລັກຍະຈຳນວນເມີດຕ່ອງຮວງຈາກພັນຖີໃຫ້ແປດົວ ດັ່ງນັ້ນຕົ້ນ  $BC_2F_1$  ທີ່ຄັດເລືອກໄດ້ຈີ່ຈະນີຍືນທີ່ຄວບຄຸມລັກຍະຈຳນວນເມີດຕ່ອງຮວງທີ່ສໍາຄັງສາມຍືນທີ່ໄດ້ຮັບຈາກພັນຖີໃຫ້ແປດົວ ອື່ອ *Gn1a, SPP1* ແລະ *Ghd7* ແລ້ວຜສນກລັນໄປໜ້າພັນຖີ กx 6 ເພື່ອຜລິຕມີດ  $BC_2F_2$  ສໍາຮັບໃຫ້ໃນການສຶກຍາຄວາມສັນພັນຂອງເຄື່ອງໝາຍ ໂມເລກຸລທີ່ອູ້ໄກລ້າຫຼືອູ້ຍືດຕິດກັບຍືນ *Gn1a, SPP1, Ghd7* ແລະ *WFP* ທີ່ຄວບຄຸມລັກຍະຈຳນວນເມີດຕ່ອງຮວງກັບຈຳນວນເມີດຕ່ອງຮວງໃນຄຸຕູກທີ 5

#### 4.1.4 การคัดเลือกต้น $BC_3F_1$ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น  $BC_3F_1$  ที่ได้จากข้อ 4.1.3 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ไกล์หรือยືດຕິດກັບຍືນ *Gn1a, SPP1* ແລະ *Ghd7* ທີ່ຄັດເລືອກໄດ້ ດັ່ງເຊັ່ນວິທີການເດີວກັບຂອງ 4.1.3 ຜຶ່ງຕົ້ນ  $BC_3F_1$  ທີ່ຄັດເລືອກໄດ້ຈີ່ຈະນີຍືນທີ່ຄວບຄຸມລັກຍະຈຳນວນເມີດຕ່ອງຮວງທີ່ສໍາຄັງສາມຍືນທີ່ໄດ້ຮັບຈາກພັນຖີໃຫ້ແປດົວ ອື່ອ *Gn1a, SPP1* ແລະ *Ghd7* ແລ້ວຜສນກລັນໄປໜ້າພັນຖີ กx 6 ເພື່ອຜລິຕມີດ  $BC_4F_1$  ຕ່ອໄປ ພະເຕີວກັບການຜສນຕົວເອງຂອງຕົ້ນ  $BC_3F_1$  ເພື່ອຜລິຕມີດ  $BC_3F_2$

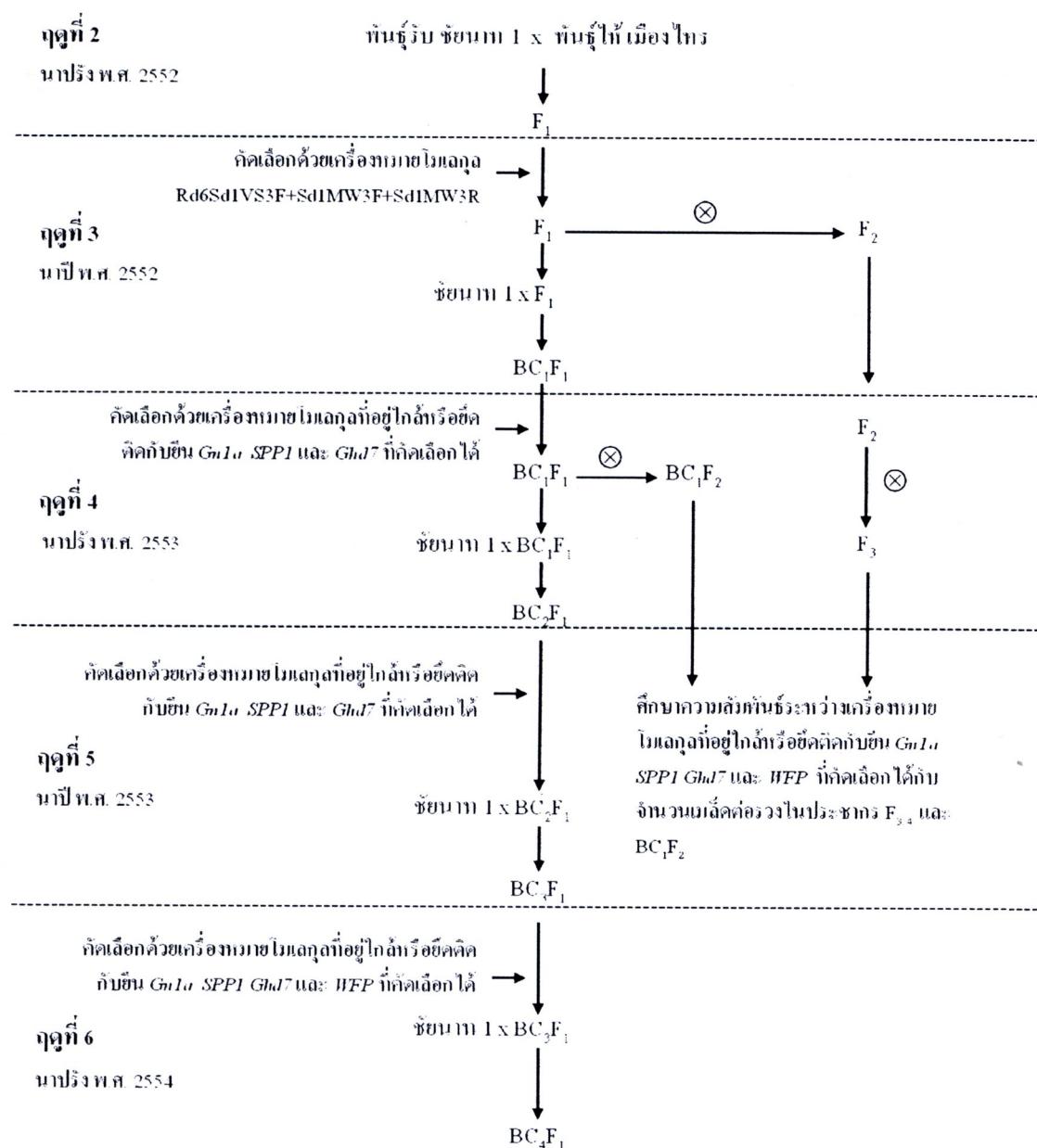
#### 4.1.5 การคัดเลือกต้น $BC_4F_1$ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น  $BC_4F_1$  ที่ได้จากข้อ 4.1.4 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ตັນທີ່ຕ້ອງການ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM23428 ที่อยู่ไກລ້າຫຼືອູ້ຍືດຕິດກັບຍືນ *WFP* ກັດເລືອກຕົ້ນ  $BC_4F_1$  ທີ່ມີຈີໂນໄກປໍແບນເຊທເຫວໂຣໄຊກສ ຄື່ອມື່ນາດຂອງແບນດີເອົ້າເອົ້າກັບແບນດີເອົ້າເອຂອງທັ້ງ กx 6 ແລະ ແປດົວ ແສດວ່າເປັນຕົ້ນທີ່ໄມ່ໄດ້ເກີດຈາກການຜສນຕົວເອງຂອງຕົ້ນ กx 6 ແລະ ໄດ້ຮັບອັລືລືຂອງຍືນ *WFP* ທີ່ຄວບຄຸມລັກຍະຈຳນວນເມີດຕ່ອງຮວງຈາກພັນຖີໃຫ້ແປດົວ ຈາກນັ້ນນຳຕົ້ນ  $BC_4F_1$  ທີ່ຄັດເລືອກໄດ້ການກັດເລືອກຕ່ອງດ້ວຍ

เครื่องหมายโมเลกุล RM10395 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* โดยคัดเลือกต้น  $BC_4F_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโรไชกัส คือมีขนาดของแอบดีเอ็นเอท่ำกว่ากันแอบดีเอ็นเอของห้อง กข 6 และแปดริว ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลิสของยีน *SPP1* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริว จากนั้นทำการคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM10318 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* คัดเลือกต้น  $BC_4F_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโรไชกัส คือมีขนาดของแอบดีเอ็นเอท่ำกว่ากันแอบดีเอ็นเอของห้อง กข 6 และแปดริว ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลิสของยีน *Gn1a* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริว และคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมาย RM21335 ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* คัดเลือกต้น  $BC_4F_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโรไชกัส คือมีขนาดของแอบดีเอ็นเอท่ำกว่ากันแอบดีเอ็นเอของห้อง กข 6 และแปดริว ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลิสของยีน *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้แปดริว ดังนั้นต้น  $BC_4F_1$  ที่คัดเลือกได้นี้จะมียืนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยืนที่ได้รับจากพันธุ์ให้แปดริว คือ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แล้วทำการผสมตัวเองของต้น  $BC_4F_1$  เพื่อผลิตเมล็ด  $BC_4F_2$  สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงต่อไป

#### 4.2 คู่ผสมของข้าวพันธุ์ชั้นนาท 1 กับพันธุ์เมืองไทย

วางแผนการผสมพันธุ์ข้าวของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชั้นนาท 1 กับพันธุ์เมืองไทย ดังภาพ 11 โดยเริ่มต้นการผสมในถุงที่ 2 ทำการผสมพันธุ์ข้าวพันธุ์ชั้นนาท 1 ซึ่งมีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ย 133 เมล็ด ใช้เป็นพันธุ์รับ กับข้าวพันธุ์ให้ คือ พันธุ์เมืองไทยที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ย 338 เมล็ด ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 เพื่อผลิตเมล็ด F<sub>1</sub> แล้วทำการคัดเลือกต้น F<sub>1</sub> ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R (กมลพิพิพ, 2551) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ให้แอบดีเอ็นเอผลผลิตของพีซีอาร์แตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์ชั้นนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวต้นเดียว (113 เซนติเมตร) กับข้าวพันธุ์เมืองไทยที่เป็นข้าวต้นสูง (166 เซนติเมตร) ในถุงที่ 3-6 ทำการผสมกลับ 4 ครั้ง แล้วทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละชั่ว ซึ่งในถุงที่ 3-5 ทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* เท่านั้น และในถุงที่ 6 มีรายงานวิจัยของยีน *WFP* จึงทำการค้นหา และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* เพื่อใช้คัดเลือกต้น  $BC_3F_1$  ที่แสดงแอบดีเอ็นเอแบบเซทเทอโรไชกัส หลังจากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ตามลำดับ



**ภาพ 11** แสดงแผนผังการสร้างประชากร  $F_{3,4}$  และ  $BC_1F_2$  ของคู่สมรสระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ ขั้นตอน 1 กับพันธุ์ไก่เมืองไทย เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ไม่เลกุลที่อยู่ใกล้กันหรือซ้ำกัน เช่น *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะ จำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวง

นอกจากนี้ในฤดูกาลที่ 3 ทำการทดสอบตัวเองของต้น  $F_1$  เพื่อผลิตเมล็ด  $F_2$  จากนั้นนำไปปลูกในฤดูกาลที่ 4 แล้วทำการทดสอบตัวเองของต้น  $F_1$  เพื่อผลิตเมล็ด  $F_3$  เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ไม่เลกุลที่อยู่ใกล้กันหรือซ้ำกัน เช่น *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุม

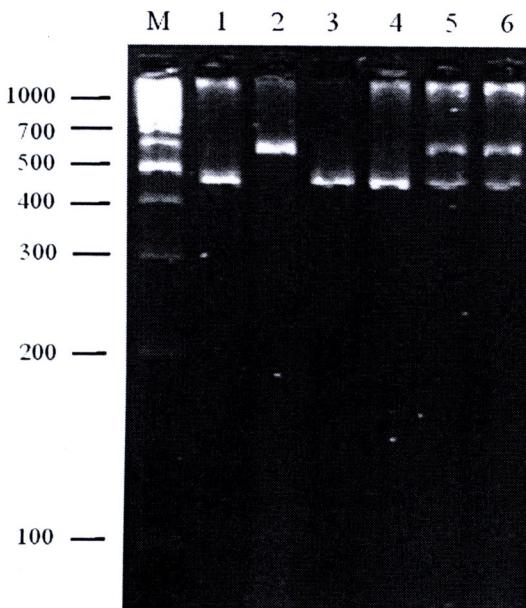
ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5 สำหรับในฤดูที่ 4 ทำการทดสอบตัวเองของต้น  $BC_1F_1$  ที่คัดเลือกได้ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือบีดติดกันยืน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* มี จีโนไทป์แบบเซทเทอร์ไซกัส เพื่อผลิตเมล็ด  $BC_1F_2$  สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือบีดติดกันยืน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุณลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5

การคัดเลือกต้น  $F_1$  และต้น  $BC_nF_1$  ของคู่ผู้สนใจว่าพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้มีเมืองไทร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ข้าวพันธุ์เมืองไทร  $F_1$  และ  $BC_nF_1$  โดยใช้ชุดสำหรับสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Genomic DNA Purification Kit ของบริษัท Fermentas) ดังวิธีการสกัดของบริษัท จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 เป็นไพรเมอร์ ซึ่งให้ขนาดของແບນดีเอ็นເອແຕກต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 กับพันธุ์ให้มีเมืองไทร แล้วตรวจผลผลิตของพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตร โฟร์ซีส ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น

#### เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก ได้แก่

- (1) เครื่องหมายโมเลกุล Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R (กมลทพย/2551) ซึ่งให้ขนาดของແບນดีเอ็นເອແຕກต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวต้นเตี้ยมีความสูง 113 เซนติเมตร กับข้าวพันธุ์ให้มีเมืองไทรซึ่งเป็นข้าวต้นสูงมีความสูง 166 เซนติเมตร โดยในแต่ละปฏิกริยาของการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย สารละลาย 2x Promega's PCR green master mix (ประกอบด้วย 400  $\mu$ M dNTPs reaction buffer (pH 9) 3 mM MgCl<sub>2</sub> และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.1 units/ $\mu$ l) ปริมาตร 7.5  $\mu$ l สารละลายไพรเมอร์ Rd6Sd1VS3F และไพรเมอร์ Sd1MW3 ชนิด forward และ reverse ที่ความเข้มข้น 5  $\mu$ M ปริมาตร 1.3  $\mu$ l และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ปริมาตร 3.5  $\mu$ l รวมปริมาตรทั้งหมด เท่ากับ 14.9  $\mu$ l 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 ทำปฏิกริยาซ้ำอีกจำนวน 35 รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รวมระยะเวลาการทำปฏิกริยาพีซีอาร์ประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโตร โฟร์ซีสตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น แล้วทำการคัดเลือกต้น  $F_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบ

เขตเทอโร่ไซกัส ที่แสดงแบบดีเอ็นเอของทั้งข้าวพันธุ์ชั้นนาท 1 ที่เป็นพันธุ์รับ และข้าวพันธุ์เมืองไทรที่เป็นพันธุ์ให้ ดังแสดงในภาพ 12



ภาพ 12 ภาพของการสแกนแสดงตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์เมื่อใช้ Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R เป็นไพรเมอร์

หมายเหตุ สัญลักษณ์กำกับ M คือ แบบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แบบดีเอ็นเอ พลพลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ชั้นนาท 1 เลนที่ 2 คือ แบบดีเอ็นเอพลพลิตของพีซีอาร์ ของข้าวพันธุ์เมืองไทร เลนที่ 3 คือ แบบดีเอ็นเอพลพลิตของพีซีอาร์ที่ใช้ดีเอ็นเอผสม ของข้าวพันธุ์ชั้นนาท 1 กับข้าวพันธุ์เมืองไทร แทนตัวอย่าง  $F_1$  เลนที่ 4-6 คือ แบบดีเอ็นเอ พลพลิตของพีซีอาร์ของต้น  $F_1$  ซึ่งต้นที่คัดเลือกได้อยู่ในเลนที่ 5 และ 6 เพราะมีขนาด ของแบบดีเอ็นเอพลพลิตของพีซีอาร์เท่ากับแบบดีเอ็นเอของทั้งชั้นนาท 1 และเมืองไทร

(2) เครื่องหมายโนมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* ที่คัดเลือกได้ คือ RM10316 ซึ่งให้ขนาดของแบบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับชั้นนาท 1 และพันธุ์ให้เมืองไทร ทำการคัดเลือกต้น  $BC_nF_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร่ไซกัสที่แสดงแบบดีเอ็นเอของทั้งชั้นนาท 1 และเมืองไทร

(3) เครื่องหมายโนมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* ที่คัดเลือกได้ คือ RM10402 ซึ่งให้ขนาดของแบบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับชั้นนาท 1 และพันธุ์ให้เมืองไทร

ทำการคัดเลือกต้น  $BC_nF_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร ไซกัสที่แสดงแบบดีเอ็นเอของทั้งชั้นนาท 1 และเมืองไทย

(4) เครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ คือ RM21330 ซึ่งให้ขนาดของแอบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับชั้นนาท 1 และพันธุ์ให้มีเมืองไทย ทำการคัดเลือกต้น  $BC_nF_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร ไซกัสที่แสดงแบบดีเอ็นเอของทั้งชั้นนาท 1 และเมืองไทย

(5) เครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *WFP* ที่คัดเลือกได้ คือ RM23433 ซึ่งให้ขนาดของแอบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับชั้นนาท 1 และพันธุ์ให้มีเมืองไทย ทำการคัดเลือกต้น  $BC_nF_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร ไซกัสที่แสดงแบบดีเอ็นเอของทั้งชั้นนาท 1 และเมืองไทย

วิธีการคัดเลือกต้น  $F_1$  และต้น  $BC_nF_1$  โดยใช้เครื่องหมายโนเมเลกุลนี้มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### 4.2.1 การคัดเลือกต้น $F_1$ โดยใช้เครื่องหมายโนเมเลกุล

ต้น  $F_1$  ที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ชั้นนาท 1 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์รับ และข้าวพันธุ์ให้ คือพันธุ์เมืองไทย ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ถูกนำมาคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโนเมเลกุล *Rd6Sd1VS3F+Sd1MW3F+Sd1MW3R* ซึ่งให้ขนาดของแอบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์รับชั้นนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวต้นเตี้ย กับพันธุ์ให้ พันธุ์เมืองไทย ซึ่งเป็นข้าวต้นสูง โดยคัดเลือกต้น  $F_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร ไซกัส คือมีขนาดของแอบดีเอ็นเอเท่ากับแอบดีเอ็นเอของทั้งชั้นนาท 1 และเมืองไทย แสดงว่าเป็นต้นที่ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวของต้นชั้นนาท 1 จากนั้นนำต้น  $F_1$  ที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์รับชั้นนาท 1 เพื่อผลิตเมล็ด  $BC_1F_1$  ขณะเดียวกันทำการผสมตัวของต้น  $F_1$  เพื่อผลิตเมล็ด  $F_2$  สำหรับใช้สร้างประชากร  $F_2$  ในฤดูที่ 4 เพื่อผลิตเมล็ด  $F_3$  สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5

#### 4.2.2 การคัดเลือกต้น $BC_1F_1$ โดยใช้เครื่องหมายโนเมเลกุล

ต้น  $BC_1F_1$  ที่ได้จากข้อ 4.2.1 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายโนเมเลกุล *RM10316* ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *Gn1a* โดยคัดเลือกต้น  $BC_1F_1$  ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร ไซกัส คือมีขนาดของแอบดีเอ็นเอเท่ากับแอบดีเอ็นเอของทั้งชั้นนาท 1 และเมืองไทย แสดงว่าเป็นต้นที่ไม่ได้เกิดจากการผสมตัวของต้นชั้นนาท 1 และได้รับอัลลิลของยีน *Gn1a* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้เมืองไทย จากนั้นนำต้น  $BC_1F_1$  ที่คัดเลือกได้ทำการคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโนเมเลกุล *RM10402* ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีน *SPP1* คัดเลือกต้น

$BC_1F_1$ , ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร ไซกัส คือมีขนาดของแอบดีเอ็นเอเท่ากับแอบดีเอ็นเอของหั้งชัยนาท 1 และเมืองไทย ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลิลของยีน *SPP1* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้เมืองไทย ทำการคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM21330 ที่อยู่ใกล้หรือบีดติดกับยีน *Ghd7* คัดเลือกต้น  $BC_1F_1$ , ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร ไซกัส คือมีขนาดของแอบดีเอ็นเอเท่ากับแอบดีเอ็นเอของหั้งชัยนาท 1 และเมืองไทย ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลิลของยีน *Ghd7* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงจากพันธุ์ให้เมืองไทย ดังนั้นต้น  $BC_1F_1$ , ที่คัดเลือกได้จะมียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญสามยีนที่ได้รับจากพันธุ์ให้เมืองไทย คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แล้วผสานกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เพื่อผลิตเมล็ด  $BC_2F_1$ , ต่อไป ขณะเดียวกันทำการผสานตัวเองของต้น  $BC_1F_1$ , เพื่อผลิตเมล็ด  $BC_1F_2$  เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือบีดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงในฤดูที่ 5

#### 4.2.3 การคัดเลือกต้น $BC_2F_1$ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น  $BC_2F_1$ , ที่ได้จากข้อ 4.2.2 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือบีดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ ดังเช่นวิธีการเดียวกับข้อ 4.2.2 ซึ่งต้น  $BC_2F_1$ , ที่คัดเลือกได้จะมียีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญสามยีนที่ได้รับจากพันธุ์ให้เมืองไทย คือ *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* แล้วผสานกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เพื่อผลิตเมล็ด  $BC_3F_1$ , ต่อไป ขณะเดียวกันทำการผสานตัวเองของต้น  $BC_2F_1$ , เพื่อผลิตเมล็ด  $BC_2F_2$

#### 4.2.4 การคัดเลือกต้น $BC_3F_1$ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ต้น  $BC_3F_1$ , ที่ได้จากข้อ 4.2.3 ถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือบีดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้ ดังเช่นวิธีการเดียวกับข้อ 4.2.3 จากนั้นคัดเลือกต่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM23433 ที่อยู่ใกล้หรือบีดติดกับยีน *WFP* ทำการคัดเลือกต้น  $BC_3F_1$ , ที่มีจีโนไทป์แบบเซทเทอโร ไซกัส คือมีขนาดของแอบดีเอ็นเอเท่ากับแอบดีเอ็นเอของหั้งชัยนาท 1 และเมืองไทย ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับอัลลิลของยีน *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญสี่ยีนที่ได้รับจากพันธุ์ให้เมืองไทย คือ *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* แล้วทำการผสานตัวเองของต้น  $BC_3F_1$ , เพื่อผลิตเมล็ด  $BC_3F_2$  สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือบีดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงกับจำนวนเมล็ดต่อรวงต่อไป

**4.3 การผลิตเมล็ดเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ในกลีบหรือเย็ดติดกับยืน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรังกับจำนวนเมล็ดต่อรัง**

การผลิตเมล็ดเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ในกลีบหรือเย็ดติดกับยืน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรังกับจำนวนเมล็ดต่อรัง ใช้เมล็ด  $F_2$  และ  $BC_2F_2$  ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับ กข 6 กับพันธุ์ไฮเปอร์ริวที่ผลิตได้ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2552 และฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 ตามลำดับ สำหรับคู่ผสมของข้าวพันธุ์รับชั้นนาท 1 กับพันธุ์ไฮเมืองไทรใช้เมล็ด  $F_3$  และ  $BC_1F_2$  ที่ผลิตได้ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 ทำการสร้างประชากรจากเมล็ดดังกล่าวเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ในกลีบหรือเย็ดติดกับยืน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรังในประชากรดังกล่าวในฤดูนาปี พ.ศ. 2553

**การทดลองที่ 5 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ในกลีบหรือเย็ดติดกับยืน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรังในประชากร  $F_2$  และ  $BC_2F_2$  ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ไฮที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์ไฮเปอร์ริว**

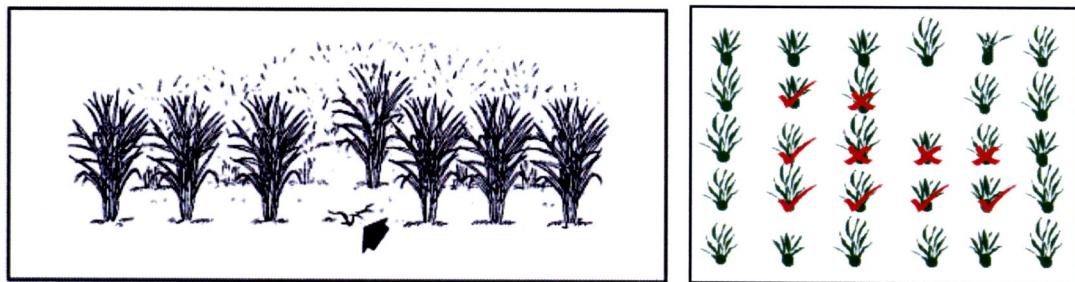
ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ในกลีบหรือเย็ดติดกับยืนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรังที่สำคัญทั้งสี่ยืน ได้แก่ ยืน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรังของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ไฮที่คัดเลือกได้ คือพันธุ์ไฮเปอร์ริว โดยทำการศึกษาทั้งหมดสองฤดู ได้แก่ ฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2552 ใช้ประชากร  $F_2$  และฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553 ใช้ประชากร  $BC_2F_2$  ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ได้จากข้อมูลฟิโน่ไทยปี และจีโน่ไทยปีของประชากรดังกล่าว

**5.1 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ในกลีบหรือเย็ดติดกับยืน *Gn1a, SPP1, Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรัง**

#### 5.1.1 การเก็บข้อมูลฟิโน่ไทยปี

ทำการเก็บข้อมูลฟิโน่ไทยปีโดยสุ่มเก็บรังข้าวของต้น  $F_2$  และ  $BC_2F_2$  ที่มีอัตราการแบ่งขันเท่ากัน กล่าวคือ เก็บตัวอย่างต้นข้าวที่มีต้นข้าว กอ อื่นนานาข้างครบทั้งสี่ด้าน หรือในกรณีที่มีต้นข้าวตาย ห้ามเก็บต้นข้าว กอ ที่อยู่ด้านข้างทั้งสี่ด้าน ดังภาพ 13 เนื่องจากต้นข้าวดังกล่าวจะได้รับอาหารมากกว่าต้นข้าวที่มีต้นข้าว กอ อื่นนานาข้างครบทั้งสี่ด้าน ข้อมูลที่ได้จึงคลาดเคลื่อน ทำการ

รวบรวมรวมข้าวทั้งหมดในแต่ละกอ แล้วเก็บรวมข้าวที่อยู่บนตำแหน่งสูงที่สุดของแต่ละกอ จำนวน 5 รung ทำการแยกเก็บแต่ละกอ จากนั้นทำการนับจำนวนเมล็ดดี และเมล็ดเสื่อมรวมกันทั้งหมด แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดต่อรung สำหรับแต่ละต้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพืโนไทร์สำหรับการวิเคราะห์



ภาพ 13 แสดงแผนภาพการเก็บตัวอย่างต้นข้าวที่มีอัตราการแบ่งขั้นเท่ากัน

หมายเหตุ เครื่องหมายถูกแสดงต้นข้าวที่สามารถใช้เป็นตัวอย่างได้ และเครื่องหมายกาบทแสดงต้นข้าวที่ไม่สามารถใช้เป็นตัวอย่างได้

ที่มา: Gomez (1972)

### 5.1.2 การตรวจสอบจีโนไทร์

ทำการตรวจสอบจีโนไทร์โดยใช้เครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远從กับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรung ที่สำคัญทั้งสี่ยีน ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.1 ได้แก่ ยีน *Gn1a* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10318 ยีน *SPP1* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM10395 ยีน *Ghd7* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM21335 และยีน *WFP* ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RM23428 โดยประชากร  $F_2$  และ  $BC_2F_2$  จะมีการกระจายตัวของยีนได้จีโนไทร์ 3 แบบ คือ homozygous ของพันธุ์รับ homozygous ของพันธุ์ให้ และ heterozygous ซึ่งตัวอย่างต้นข้าวที่มีจีโนไทร์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 0 ต้นข้าวที่มีจีโนไทร์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 2 และต้นข้าวที่มีจีโนไทร์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 เพื่อใช้เป็นข้อมูลของจีโนไทร์สำหรับการวิเคราะห์

### 5.1.3 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远從กับยีน *Gn1a*, *SPP1* และ *Ghd7* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรung

นำข้อมูลพืโนไทร์ และจีโนไทร์ที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ (regression) ระหว่างเครื่องหมายโนเมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远從กับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรung ที่สำคัญ

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

## 5.2 การวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远离 จัดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่มีความสัมพันธ์ กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

ทำการวิเคราะห์ค่าสมการถดถอยหลายตำแหน่งด้วยวิธี multiple-locus regression analysis เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมาย SSR marker ที่อยู่ใกล้หรือ远离 จัดติดกับยีนทั้งหมดนั้น เครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมากที่สุดในประชากร  $F_2$  และ  $BC_2F_2$  ของคู่สมระหว่างข้าวพันธุ์ กบ 6 กับพันธุ์แปดริ้ว

การทดลองที่ 6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远离 จัดติดกับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงในประชากร  $F_{3,4}$  และ  $BC_1F_2$  ของคู่สมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ให้ที่คัดเลือกได้ คือ พันธุ์เมืองไทร

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远离 จัดติด กับยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงที่สำคัญทั้งสี่ยีน ได้แก่ ยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวงของคู่สมระหว่างข้าวพันธุ์รับพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวพันธุ์ ให้พันธุ์เมืองไทร ทำการศึกษาในฤดูนาปี (กรกฎาคม – ธันวาคม) พ.ศ. 2553 โดยใช้ประชากร  $F_{3,4}$  และ  $BC_1F_2$  ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ได้จากข้อมูลพีโน้ไทยปี และจีโน้ไทยปีของประชากร ดังกล่าว

## 6.1 การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远离 จัดติด กับยีน *Gn1a*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กับจำนวนเมล็ดต่อรวง

### 6.1.1 การเก็บข้อมูลพีโน้ไทยปี

ทำการเก็บข้อมูลพีโน้ไทยปีโดยทำการสุ่มเก็บร่วงข้าวของต้น  $F_{3,4}$  และ  $BC_1F_2$  ที่มี อัตราการแข่งขันเท่ากัน เช่นเดียวกับการเก็บข้อมูลพีโน้ไทยปีในข้อที่ 5.1.1 ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว ข้างต้น

### 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  $BC_1F_2$  ของคู่ผู้สมรสระหว่างข้าวพันธุ์ชั้นนำที่ 1 กับพันธุ์เมืองไทร

## สถานที่ และระยะเวลาในการทดลอง

### สถานที่ทำการทดลอง

1. การวิจัยทางด้านชีวโมเลกุล ทำงานวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุลของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่
2. การวิจัยทางด้านการพัฒนาพันธุ์ข้าว ทำการพัฒนาพันธุ์ข้าวที่โรงเรือนกระจกของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่
3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือ远ติดกับยีน *Gnla*, *SPP1*, *Ghd7* และ *WFP* ที่คัดเลือกได้กันจำนวนเมล็ดต่อร่วง ทำการศึกษาในพื้นที่บริเวณฟาร์มวิจัย และพัฒนาการผลิตพืชไร่ของภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่

### ระยะเวลาการทำการวิจัย

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