บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานทดลองนี้ศึกษาที่ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2544 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2546 แบ่งเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 เป็นการทดสอบตัวอย่าง และการทดลองที่ 2 เป็นการทดสอบรุ่นลูกของตัวอย่าง โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1 พันธุกรรม

ตัวอย่างข้าวที่เก็บรวมรวมเพื่อศึกษาในงานทดลองนี้มีจำนวนทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

1. ข้าวป่า (*O. rufipogon*) ที่พบในสภาพธรรมชาติจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่
   - ข้าวป่าจากธนาคารข้าว ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร (No. 5503)
   - ข้าวป่าที่พบในคลองส่งน้ำชลประทานในบ้านป่าขาม ต.อุโมงค์ อ.เมือง จ. ลำพูน (LP) โดยสุ่มเก็บให้ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมดได้ 21 จุด
   - ข้าวป่าที่พบในคลองส่งน้ำชลประทานแม่แฝก อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ (CM)โดยสุ่มเก็บให้ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมดได้ 22 จุด
2. ข้าววัชพืชที่มีลักษณะข้าวป่าที่พบระบาดในแปลงข้าวปลูกของเกษตรกร 1 แปลง จากจังหวัดกาญจนบุรี (Weedy rice with awn) จำนวน 14 ตัวอย่าง (WS#1 - WS#14) สุ่มเก็บในแปลงเกษตรกรโดยเก็บตัวอย่างตามความยาวหางและสีของเปลือกหุ้มเมล็ดของข้าว
3. ข้าวแดงที่พบในแปลงข้าวปลูกในจังหวัดกาญจนบุรี (Red rice) จำนวน 4 ตัวอย่าง (RS#1 - RS#4) สุ่มเก็บในแปลงเกษตรกร โดยเก็บตัวอย่างตามสีของเปลือกหุ้มเมล็ด
4. ข้าวพันธุ์ปลูกจากธนาคารข้าว ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร (Cultivated rice) จำนวน 1 ตัวอย่าง คือ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 (SPR1)

ทุกการทดลองก่อนปลูกเพาะเมล็ดให้งอกใน petri dish เป็นเวลา 3 วัน เมื่อข้าวงอกแล้วจึงย้ายปลูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การทดลองที่ 1 การทดสอบตัวอย่าง

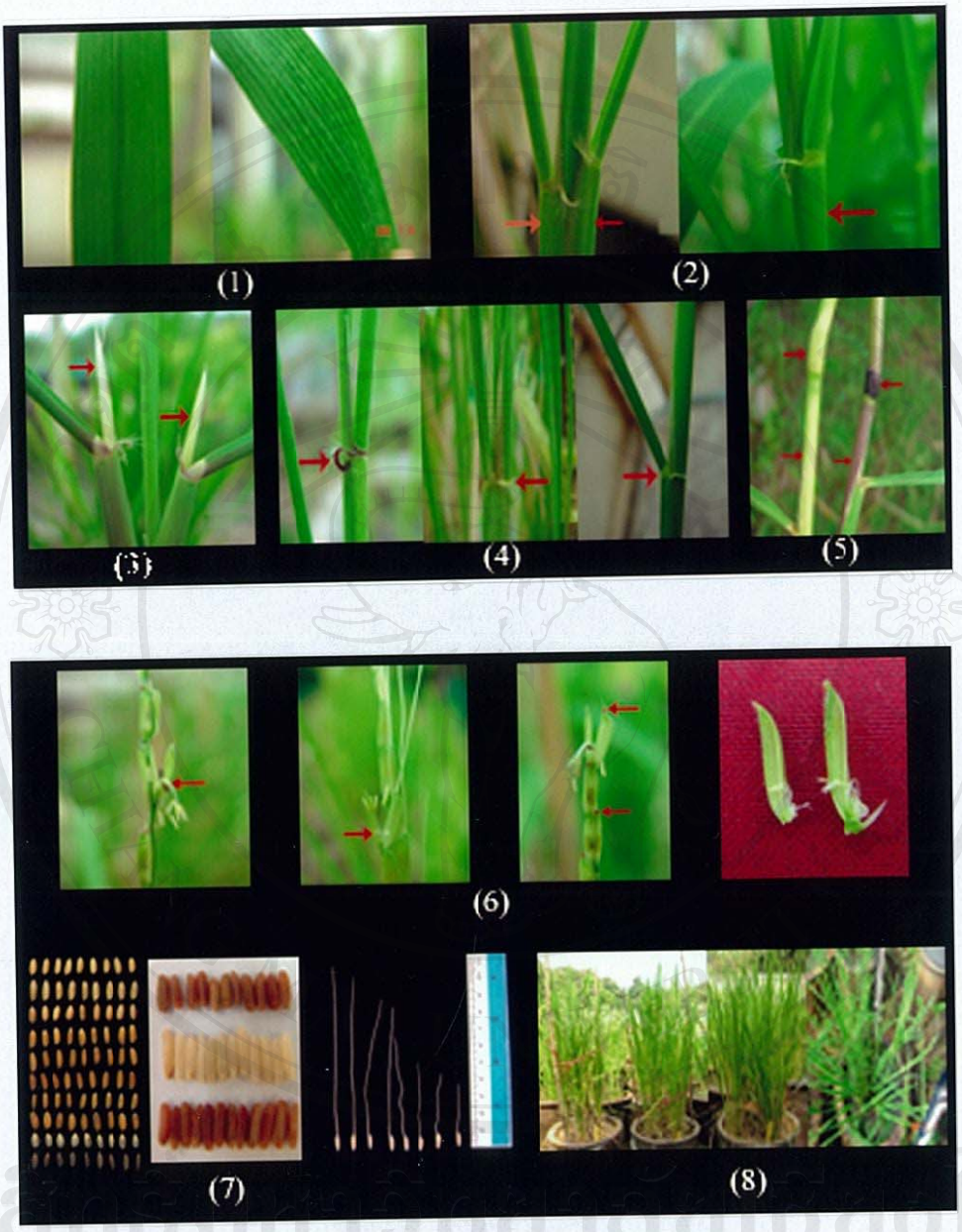
ปลูกตัวอย่างข้าวทั้งหมดในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ซม. โดยปลูกตัวอย่างละ 2 กระถาง กระถางละ 6 ต้น โดยเริ่มปลูกในช่วงกลางเดือนกรกฎาคมและเมื่อต้นข้าวถึงระยะแตกกอเก็บตัวอย่างใบของแต่ละต้นเพื่อวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลโดยเก็บตัวอย่างใบของแต่ละต้นแยกในถุงบรรจุซิลิกาเจลเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างแห้งและรักษาสภาพดีเอ็นเอไว้จากนั้นนำตัวอย่างแห้งที่ได้เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ –20 °C เพื่อใช้ในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ บันทึกลักษณะต่างๆ ของข้าวแต่ละต้นทุกต้น แบ่งเป็นลักษณะทางคุณภาพจำนวน 17 ลักษณะ และลักษณะทางปริมาณจำนวน 8 ลักษณะ โดยระยะแตกกอบันทึกลักษณะทรงกอ สีของแผ่นใบ สีของกาบใบ สีของหูใบ สีลิ้นใบ รูปร่างลิ้นใบ สีข้อ สีปล้อง สีข้อต่อใบ ระยะออกรวงบันทึกลักษณะอายุออกรวง (จำนวนวันหลังงอก) สียอดเกสรตัวเมีย ลักษณะการโผล่ของเกสรตัวเมีย สีกลีบรองดอก สียอดดอก หางข้าว สีของหางข้าว และระยะเก็บเกี่ยวบันทึกลักษณะสีเปลือกหุ้มเมล็ด และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ความสูงของข้าวถึงคอรวง (บันทึกทุกต้น) ความยาวรวง จำนวนดอกต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี เปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบ เปอร์เซ็นต์เมล็ดร่วง และจำนวนระแง้ต่อรวง (บันทึกทุกรวง) (IRRI-IBPRG, 1980) รายละเอียดการบันทึกแต่ละลักษณะแสดงไว้ในภาคผนวก 1

สำหรับการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลนำตัวอย่างใบพืชที่ได้เก็บไว้มาสกัดดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้เทคนิค RAPD และMicrosattelite ซึ่งได้แสดงรายระเอียดของวิธีการในภาคผนวก 3 ถึงภาคผนวก 15

3.3 การทดลองที่ 2 การทดสอบรุ่นลูกของตัวอย่าง (ฤดูปลูกที่ 2)

เป็นการปลูกทดสอบการกระจายตัวของลูกที่ได้จากการทดลองที่ 1 โดยนำข้าวที่เก็บแบบแยกรวงมาปลูกแบบรวงต่อแถวตัวอย่างละ 5 รวง เพื่อดูการกระจายตัวภายในต้น โดยเพาะเมล็ดของแต่ละรวงในตะกร้าขนาด 20 x 40 ซม. เมื่อต้นกล้าอายุได้ 30 วัน ย้ายปักดำในแปลงทดลองขนาด 1.5 x 20 เมตร โดยปักดำต้นกล้าจากแต่ละรวงแบบ 1 ต้นต่อหลุมจำนวน 1 แถว แถวละ 20 ต้น ใช้ระยะปลูกระหว่างต้น 25 ซม. และระยะระหว่างแถว 25 ซม. บันทึกลักษณะต่างๆ ของข้าวแยกแต่ละต้นทุกต้นเหมือนการทดลองที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 ตัวอย่างภาพของลักษณะทางคุณภาพที่ใช้ในการประเมิน โดย (1) = สีแผ่นใบ (2) = สีกาบใบ (3) = สีลิ้นใบและรูปร่างลิ้นใบ (4) = สีหูใบและสีข้อต่อใบ (5) = สีข้อและสีปล้อง (6) = สียอดเกสรตัวเมีย สียอดดอก และสีกลีบรองดอก (7) = สีเปลือกเมล็ด, สีเยื่อหุ้มเมล็ดและหางข้าว (8) = ทรงกอ (ภาพทั้งหมดไม่ได้อยู่ในมาตราส่วนเดียวกัน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

พิจารณาความหลากหลายของลักษณะคุณภาพโดยใช้ค่าดัชนีความหลากหลาย Shannon's index (H') โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้ (Shannon and Weaver, 1949 อ้างโดย Power and McSoley, 2000)

$$H' = -\sum_{i=1}^{S} pi \ln pi$$

โดย s คือ จำนวนชนิดที่พบ

pi คือ สัดส่วนของชนิดนั้นต่อจำนวนทั้งหมด

ในการพิจารณาหากพบว่าค่า H' เท่ากับศูนย์ แสดงว่าทุกต้นในตัวอย่างเหมือนกันหมด เมื่อค่า H' มีค่าสูงขึ้นแสดงว่ามีความหลากหลายสูงขึ้น

และทำการแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวที่ศึกษาจากลักษณะคุณภาพ 17 ลักษณะ โดยใช้วิธี Principle Component Analysis จากโปรแกรม NTSYSpc (Rohlf, 1998) ส่วนลักษณะทางปริมาณนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนความคลาดเคลื่อน (se) ค่าขอบเขตของค่าเฉลี่ย (range) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV%) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกับพันธุ์ตรวจสอบมาตรฐานโดยใช้ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

ส่วนข้อมูลในระดับโมเลกุลพิจารณาโดยนำภาพถ่ายลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอที่น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เดียวกัน โดย 0 หมายถึง ไม่มีแถบ และ 1 หมายถึง ปรากฏแถบ โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างโดยวิธี cluster analysis ด้วยโปรแกรม *POPGENE* (Population Genetic Analysis) (Yeh *et al.*, 1997) ในการคำนวณค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) (Nei, 1972) และนำค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมที่ได้มาสร้าง UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) dendrogram โดยโปรแกรม *MEGA 2* (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, Version 2.1) (Kumar *et al.*, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved