บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วย 3 การทดลอง การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาความสามารถในการสร้างลูกผสมระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูก โดยใช้ข้าวป่าเป็นพ่อและข้าวปลูกเป็นแม่และนำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) มาใช้ในการทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆ เปรียบเทียบกับต้นพ่อและต้นแม่ นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) มาปลูกทดสอบในการทดลองที่ 3 เพื่อศึกษาการกระจายตัวของลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆ

ทุกการทดลองก่อนปลูก เพาะเมล็ดพันธุ์ใน petri dishes บนกระดาษกรองชุบน้ำจนชุ่ม แล้วจึงย้ายปลูกลงในกระถาง ศึกษาที่เรือนทดลอง ภาควิชาพืชไร่และศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2544 และสิ้นสุดเดือนธันวาคม 2546

พันธุกรรม

การทดลองนี้ใช้ประชากรข้าวป่าจำนวน 2 ประชากร และข้าวปลูกจำนวน 7 พันธุ์ เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ประกอบด้วย

ข้าวป่า *Oryza rufipogon* Griff. จำนวน 2 ประชากร ได้แก่

ข้าวป่า *O. rufipogon* G.S.No.18883 จากธนาคารข้าว

ข้าวป่า *O. rufipogon* จาก ตำบลป่าเส้า อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

ข้าวปลูก จำนวน 7 พันธุ์ ได้แก่

ขาวดอกมะลิ 105 ชัยนาท 1 กข 6 กข 10 เหนียวสันป่าตอง ซิวแม่จันและก่ำดอยสะเก็ด

3.1 ศึกษาความสามารถในการสร้างลูกผสมระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูก

ปลูกข้าวป่าจำนวน 2 ประชากร และข้าวปลูกจำนวน 7 พันธุ์ ปลูกลงในกระถางบรรจุดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร โดยปลูกแบบหยอดเมล็ดจำนวน 1 ต้นต่อหลุม จำนวน 5 ต้นต่อกระถาง พันธุ์ละ 3 กระถาง จัดช่วงระยะเวลาการปลูกโดยเว้นระยะเวลาครั้งละ 10 วัน รวมทั้งหมด 4 ช่วงวันปลูก (planting date) เพื่อให้ข้าวมีช่วงเวลาออกดอกพร้อมกัน ผสมพันธุ์ระหว่างข้าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ป่าและข้าวปลูกในระยะที่ข้าวพร้อมผสมพันธุ์เมื่อข้าวป่าและข้าวปลูกออกดอกพร้อมกัน โดยให้ข้าวป่าเป็นต้นพ่อและข้าวปลูกเป็นต้นแม่ กำหนดให้ใช้ 1 อับละอองเกสรตัวผู้ (anther) ของข้าวป่าต้นพ่อ ต่อ 3 ดอกย่อย (spikelet) ของข้าวปลูกต้นแม่

สามารถสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูกได้ 7 คู่ผสม ประกอบด้วย

1. ขาวดอกมะลิ 105	x	*O. rufipogon* (ลำพูน)
2. ก่ำดอยสะเก็ด	x	*O. rufipogon* (ลำพูน)
3. เหนียวสันป่าตอง	x	*O. rufipogon* (ลำพูน)
4. กข 6	x	*O. rufipogon* (ลำพูน)
5. กข 10	x	*O. rufipogon* (ลำพูน)
6. ชิวแม่จัน	x	*O. rufipogon* (18883)
7. ชัยนาท 1	x	*O. rufipogon* (18883)

เมื่อถึงระยะสุกแก่เก็บรวงที่ผสมพันธุ์ทุกรวง จากทุกคู่ผสมมาตรวจนับจำนวนดอกข้าวที่ผสมพันธุ์ จำนวนดอกที่ผสมติดเมล็ด เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดและเก็บเมล็ดแยกแต่ละรวงเพื่อทดสอบในรุ่นลูกต่อไป

3.2 การประเมินลักษณะระหว่างลูกผสมชั่วที่ 1 เปรียบเทียบกับต้นพ่อและต้นแม่

ทดลองในฤดูนาปี 2545 ที่แปลงทดลองของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยนำเมล็ดของพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้ง 7 คู่ผสม มาเพาะใน petri dishes บนกระดาษกรองชุบน้ำจนชุ่ม ตัวอย่างละ 20 เมล็ด วัดเปอร์เซ็นต์ความงอกและเปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนปกติเมื่อต้นอ่อนมีอายุ 7 วัน (นับจากวันแรกที่เพาะ) และย้ายต้นที่สมบูรณ์ลงปลูกในกระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ปลูกพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 1 ต้นต่อหลุม กระถางละ 5 ต้น แต่ละคู่ผสมวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกข้อมูล

เมื่อถึงระยะออกรวงและระยะเก็บเกี่ยว บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา แยกแต่ละต้นทุกต้น โดยบันทึกตามแบบบันทึกลักษณะข้าวป่าศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ (สงกรานต์, 2538)

<u>ระยะออกรวง</u>

ลักษณะทรงกอ (1 = กอตั้ง 5 = กอเอน 9 = แผ่-นอน)

สีแผ่นใบ (1 = เขียว 2 = เขียวเข้ม 3 = ม่วงที่ปลาย 4 = ม่วงที่ริม 5 = ม่วงทั้งใบ)

สีกาบใบ (1 = เขียว 2 = เขียวเข้ม 3 = ม่วงอ่อน 4 = ม่วง)

สีหูใบ (1 = ขาว 2 = ม่วง)

สียอดดอก (1 = ขาว 2 = น้ำตาล 3 = แดง 4 = ม่วงดำ)

สีเกสรตัวเมีย (1 = ขาว 2 = แดง 3 = ม่วง 4 = ดำ)

สีปล้อง (1 = เขียว 2 = เหลืองอ่อน 3 = เขียวมีเส้นม่วง 4 = ม่วง X = อื่นๆ)

สีหาง (1 = ขาว 2 = เหลือง 3 = แดง 4 = ดำ)

การมีหาง (1 = ไม่มี 2 = มี)

การแสดงอาการโรคใบสีส้ม

0 = ไม่มีการแสดงอาการของโรค

1 = แสดงอาการของโรคเล็กน้อย

3 = แสดงอาการของโรคปานกลาง

4 = แสดงอาการของโรคมาก

5 = แสดงอาการของโรคมากที่สุด

จำนวนหน่อต่อต้น

<u>ระยะเก็บเกี่ยว</u>

ความสูงของปล้องที่ระยะเก็บเกี่ยว (เซนติเมตร) จำนวนรวงต่อต้น จำนวนดอกย่อยต่อรวง จำนวนระแง้ต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี เปอร์เซ็นต์เมล็ดร่วง สีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ด

เมื่อถึงระยะสุกแก่เก็บทุกรวงของแต่ละต้น เพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ในการสร้างลูกผสมชั่วที่ 2 ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลลักษณะทางปริมาณที่ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล Microsatellite markers

จากการพิจารณาลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่และพันธุ์ลูกผสม ที่ประเมินในขั้นต้นโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ยืนยันความเป็นลูกผสมโดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล Microsatellite markers โดยอาศัยเทคนิค PCR ดังนั้นจึงเก็บตัวอย่างใบของแต่ละตัวอย่างพันธุ์แยกต้นทุกต้น ทดลองในกระถาง เก็บตัวอย่างใบในซิลิกาเจลเพื่อใช้เป็นตัวอย่างแห้งและรักษาสภาพดีเอ็นเอไว้ จากนั้นนำตัวอย่างแห้งที่ได้เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987)

การเตรียมตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างใบแห้งที่เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามขั้นตอนดังนี้

การสกัดดีเอ็นเอ

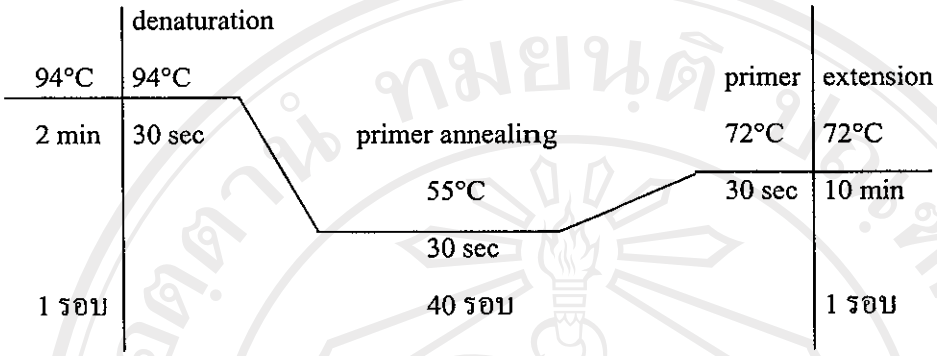
การสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) โดย extraction buffer ประกอบด้วย double deionized water, 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl และ 0.4%, ß-mercaptoethanol แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (ปฏิกิริยา PCR)

ปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) และการทำ Agarose Gel Electrophoresis

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มขยายปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยเทคนิค Microsatellite markers โดยใช้ไพร์เมอร์ RM 1 และ RM 211 โดยการใส่สารผสมปริมาตรประมาณ 20 ไมโครลิตร ซึ่ง ประกอบไปด้วย double deionized water 15.0 ไมโครลิตร 10X buffer 2.0 ไมโครลิตร 50 mM $MgCl_2$ 1.0 ไมโครลิตร 25 mM dNTP 0.16 ไมโครลิตร 100 µM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

primer 5 unit Taq DNA polymerase 0.125 ไมโครลิตรและ DNA template 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่อง PCR เพื่อทำตามเงื่อนไขดังนี้



เงื่อนไขของการทำ PCR

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 5.0% agarose gel electrophoresis นำเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide 5 µl/TBE buffer 100 ml เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาลอยด์เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบความเป็นลูกผสมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยพิจารณาการเกิดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและแถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ที่ปรากฏในแถบดีเอ็นเอของลูกผสม ลูกผสมที่ได้จะปรากฏแถบดีเอ็นเอจากพ่อแม่อย่างละครึ่ง

3.4 ศึกษาการกระจายตัวของพันธุกรรมต่างๆ ในลูกผสมชั่วที่ 2

ทดลองในฤดูนาปี 2546 ที่แปลงทดลองของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยนำเมล็ดของพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมชั่วที่ 2 มาเพาะใน petri dishes บนกระดาษกรองชุบน้ำจนชุ่ม ตัวอย่างละ 200 เมล็ด วัดเปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนปกติ เมื่อต้นอ่อนมีอายุ 7 วัน (นับจากวันแรกที่เพาะ) และย้ายต้นที่สมบูรณ์ลงในกระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ปลูกพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 1 ต้นต่อหลุม กระถางละ 10 ต้น ปลูกพันธุ์พ่อ 20 ต้น พันธุ์แม่ 20 ต้น และและลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 200 ต้นต่อคู่ผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อถึงระยะออกรวงและระยะเก็บเกี่ยวได้บันทึกลักษณะแต่ละต้นทุกต้น โดยบันทึกตามแบบบันทึกลักษณะข้าวป่าศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ (สงกรานต์, 2538)

ระยะออกรวง บันทึกลักษณะทรงกอ การมีหาง สีหาง สียอดดอก สีเกสรตัวเมีย

ระยะเก็บเกี่ยว ความสูงของปล้องที่ระยะเก็บเกี่ยว (เซนติเมตร)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ในลูกผสมชั่วที่ 2 โดยใช้ chi square (χ^2 test)

1. ถ้าลักษณะสีถูกควบคุมด้วยยีน 1 คู่

   1.1 มีการกระทำของยีนเป็นแบบข่มสมบูรณ์ (complete dominance)

   อัตราส่วนของ genotype = 3 AA+Aa : 1aa

   อัตราส่วนของ phenotype = 3 ม่วง : 1 ขาว

   1.2 มีการกระทำของยีนเป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (complete dominance)

   อัตราส่วนของ genotype = 1 AA : 2 Aa : 1aa

   อัตราส่วนของ phenotype = 1 ม่วง : 2 ขาวปนม่วง : 1 ขาว

2. ถ้าลักษณะสีถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่

   2.1 ถ้าสีขาวถูกควบคุมด้วย homozygous recessive (aabb) และมีการกระทำของยีนเป็นแบบข่มสมบูรณ์ (complete dominance)

   อัตราส่วนของ genotype = 15 A_B_+A_bb+aaB_:1 aabb

   อัตราส่วนของ phenotype = 15 ม่วง : 1 ขาว

   2.2 ถ้าสีขาวถูกควบคุมด้วย homozygous recessive (aabb) และสีม่วงถูกควบคุมด้วย homozygous dominance มีการกระทำของยีนเป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (complete dominance)

   อัตราส่วนของ genotype = 1 AABB : 14 A_B_+ aaB_ + A_bb : 1 aabb

   อัตราส่วนของ phenotype = 1 ม่วง : 14 ขาวปนม่วง : 1 ขาว

   2.3 ถ้าสีขาวถูกควบคุมด้วย homozygous recessive (aabb) และสีม่วงถูกควบคุมด้วย homozygous dominance และมีการกระทำของยีนเป็นแบบ (complemetary factor)

   อัตราส่วนของ genotype = 1 AABB : 8 A_B_ : 7 A_bb + aaB_+ aabb

   อัตราส่วนของ phenotype = 1 ม่วง : 14 ขาวปนม่วง : 1 ขาว

   อัตราส่วนของ genotype = 9 A_B_ : 7 A_bb + aaB_+ aabb

   อัตราส่วนของ phenotype = 9 ม่วง : 7 ขาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved