บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทดลองที่ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือน กรกฎาคม พ.ศ.2548 ถึงเดือน พฤษภาคม พ.ศ.2550 ประกอบด้วย สองการทดลอง การทดลองแรกเป็นการตรวจสอบลักษณะของข้าววัชพืชที่พบแพร่ระบาดในนาข้าวภาคกลาง การทดลองที่สอง เป็นการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ข้าวปลูกถึงการปลอมปนของพันธุกรรมข้าวป่า โดยมีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 1 ประเมินลักษณะประชากรข้าววัชพืชที่ขึ้นระบาดในแปลงปลูกของเกษตรกรในนาจากจังหวัดภาคกลาง

ตัวอย่างข้าววัชพืช

ได้รับการอนุเคราะห์ตัวอย่างจาก ดร.จรรยา มณีโชติ กรมวิชาการเกษตร โดยได้เก็บตัวอย่างจากข้าววัชพืช ต้นละ 1 รวงเก็บแยกในซองกระดาษ เก็บตัวอย่างประชากรละ 30-100 รวง รวมทั้งหมด 38 ตัวอย่าง จากแปลงที่มีรายงานว่าพบความเสียหายจากข้าววัชพืช โดยเลือกรวงที่สุกแก่ก่อนข้าวปลูก รายละเอียดที่มาของตัวอย่างได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ใช้ข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 พันธุ์คัดจากกรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

วิธีการทดลอง

แบ่งการประเมินลักษณะเป็น 2 ขั้นตอนคือ การประเมินลักษณะเมล็ดและนำไปปลูกทดสอบรุ่นลูก

1.1 การประเมินลักษณะเมล็ด

บันทึกลักษณะตัวอย่างทุกรวง บันทึกลักษณะสีเปลือกเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ด การมีหางที่ปลายเมล็ดและรูปร่างเมล็ด วัดความยาวรวง นับจำนวนระแง้ต่อรวง จำนวนเมล็ดร่วงต่อรวง เมล็ดลีบต่อรวง เมล็ดทั้งหมดต่อรวง วัดความยาวหาง

1.2 การทดสอบรุ่นลูก

แต่ละตัวอย่างสุ่มเมล็ดข้าววัชพืชมาปลูกทดสอบในกระถาง ที่แปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2548 ถึงเดือนกุมภาพันธุ์ 2550 สุ่มทุกตัวอย่างรวงละ 2-3 เมล็ดนำไป break dormancy ที่อุณหภูมิ 50° 7 วัน จากนั้นเพาะความงอกเมื่ออายุกล้าได้ 14 วันย้ายปลูกในกระถางพลาสติกบรรจุดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร โดยปลูกกระถางละ 10 ต้นปลูก 1 ต้นต่อ 1 หลุม รวมปลูก ตัวอย่างละ 30 ต้น บันทึกลักษณะทุกต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บันทึกลักษณะตามแบบบันทึกลักษณะข้าวป่าศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดพันธุ์เชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ (สงกรานต์ 2537) คือ

ระยะแตกกอ บันทึกลักษณะทรงกอ รูปร่างของลิ้นใบ บันทึกสีของ กาบใบ แผ่นใบ ลิ้นใบ และเขี้ยวใบ

ระยะออกรวง บันทึกลักษณะอายุออกดอกของแต่ละต้น ความกว้างและความยาวใบธงของรวงหลัก สียอดเมล็ด สีเกสรตัวเมีย การมีหางที่ปลายเมล็ดและสีของหาง จากนั้นใช้ถุงกระดาษไขสีขาวคลุมรวงต้นละ 2 รวง เพื่อนำมาวัดลักษณะในขั้นตอนต่อไป

ระยะเก็บเกี่ยว วัดความสูงตั้งแต่พื้นดินถึงคอรวง นับจำนวนรวงต่อต้น และสุ่ม 2 รวงต่อต้น นำมาวัดความยาวรวง นับจำนวนระแง้ต่อรวง จำนวนเมล็ดร่วงต่อรวง เมล็ดลีบต่อรวง เมล็ดทั้งหมดต่อรวง วัดความยาวหาง บันทึกสีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ดและรูปร่างเมล็ด

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของตัวอย่างข้าววัชพืชและจำนวนประชากรที่ใช้ศึกษา

แหล่งที่มา	จำนวนประชากร	จำนวนรวงต่อประชากร
กาญจนบุรี	2	90
ฉะเชิงเทรา	1	70
ชัยนาท	1	70
นครนายก	4	20
นครปฐม	5	50-60
ปทุมธานี	4	40-80
พิษณุโลก	2	30
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	1	50
สระบุรี	2	50
สิงห์บุรี	4	50-60
สุพรรณบุรี	12	40-100
อยุธยา	1	40
อ่างทอง	2	40-50
อุตรดิตถ์	1	40

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ประเมินการปนเปื้อนของพันธุกรรมข้าวป่าในเชื้อพันธุ์ข้าวปลูก

ตัวอย่างข้าวปลูก

ได้รับการอนุเคราะห์ตัวอย่างจาก ดร.จรรยา มณีโชติ กรมวิชาการเกษตร โดยสุ่มเก็บข้าว 93 ตัวอย่าง จากเกษตรกรที่มีปัญหาการระบาดของข้าววัชพืชในแปลงปลูก เมล็ดพันธุ์จำหน่ายจากร้านค้า และเมล็ดพันธุ์จำหน่ายจากผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เอกชน รายละเอียดที่มาของตัวอย่างได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 ใช้ข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 ชัยนาท 80 ปทุมธานี 1 และพิษณุโลก 2 พันธุ์คัดจากกรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

ตารางที่ 2 พันธุ์ข้าวและจำนวนประชากรที่ใช้ศึกษาในงานทดลอง

พันธุ์	เกษตรกร	ร้านจำหน่ายเมล็ดพันธุ์	ผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เอกชน	รวม
สุพรรณบุรี 1	27	13	19	59
ชัยนาท 1	-	10	8	18
ชัยนาท 80	2	-	-	2
ปทุมธานี 1	-	6	-	6
พิษณุโลก 2	6	2	-	8
รวม	35	31	27	93

วิธีการทดลอง

แบ่งการประเมินลักษณะเป็น 2 ขั้นตอนคือ การประเมินลักษณะเมล็ดและนำไปปลูกทดสอบรุ่นลูก

2.1 การประเมินลักษณะเมล็ด

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตัวอย่างละ 100 เมล็ด จำนวน 2 ซ้ำ บันทึกลักษณะ สีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ด และการมีหางของเมล็ด

2.2 การทดสอบรุ่นลูก

แยกเพาะเมล็ดพันธุ์ในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร เมื่ออายุต้นกล้า 20 วันย้ายปักดำในกระถางรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 50x70x40 เซนติเมตร^3 ปักดำทีละต้น ใช้ระยะปลูก 10X7 เซนติเมตร^2 จำนวน 50 ต้นใน 1 กระถาง โดยปลูกประชากรละ 50 ต้น มีพันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 ชัยนาท 80 ปทุมธานี 1 และพิษณุโลก 2 พันธุ์คัดจากสถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ เมื่อข้าวถึงระยะแตกกอเก็บตัวอย่างใบของแต่ละต้นละ 2-3 ใบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (เฉพาะตัวอย่างข้าวจากเกษตรกร 35 ตัวอย่าง พันธุ์สุพรรณบุรี 1 27

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่าง พิษณุโลก 2 6 ตัวอย่าง และชัยนาท 80 2 ตัวอย่าง) โดยเก็บตัวอย่างใบข้าวพับใส่ถุงกระดาษเก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างใบข้าวที่บรรจุในถุงใส่ในภาชนะปิดที่มีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดความชื้นเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างแห้งและรักษาสภาพดีเอ็นเอไว้ เพื่อใช้ในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ

เมื่อถึงระยะออกรวง บันทึกอายุออกดอกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของแต่ล่ะต้น เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยว วัดความสูงจนถึงคอรวง (เฉพาะตัวอย่างข้าวของเกษตรกร 27 ตัวอย่าง พันธุ์สุพรรณบุรี 1 19 ตัวอย่าง และชัยนาท1 8 ตัวอย่าง) บันทึกลักษณะ สีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ดและการมีหางที่ปลายเมล็ด

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบข้าวที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด โดยแยกตัวอย่างแต่ละตัวอย่างตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) ทำการสกัดดีเอ็นเอ โดย extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย double deionized water, 2% CTAB, 100 mM Tris-HCL(pH 8.0), 20 mM EDTA (pH8.0), 1.4 M NaCl และ 0.4% β-mercaptoethanol แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำ PCR (Polimerase Chian Reaction) โดยเทคนิค Microsatellite marker

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ microsatellite primers จำนวน 4 ตำแหน่ง (เฉพาะพันธุ์ชัยนาท 80 ใช้ primer RM 1 RM 341 และ RM 444 ในการตรวจสอบ) แต่ละ primers มีลำดับเบสดังนี้ (www.gramene.org)

Primers	Chro	Repeat Motif	ลำดับเบส	Anneal Temp.
			F:GCGAAAACACAATGCAAAAA	
RM1	1	(AG)26	R:GCGTTGGTTGGACCTGAC	55 °C
			F:CAAGAAACCTCAATCCGAGC	
RM341	2	(CCT)20	R:CTCCTCCCGATCCCAATC	55 °C
			F:GCTCCACCTGCTTAAGCATC	
RM444	9	(AT)12	R:TGAAGACCTTGTTCTGCAGG	55 °C
			F:ACCTCGCGTTATTAGGTACCC	
RM586	6	(CT)23	R:GAGATACGCCAACGAGATACC	55 °C

F: Forward Primer R: Reverse Primer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทคนิค PCR ทำโดยการใส่สารผสมปริมาณ 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย double deionized water 16.0 ไมโครลิตร, 10X buffer 2.0 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 1.0 ไมโครลิตร, 25mM dNTP 0.16 ไมโครลิตร, 100μM primer, 5 unit Taq DNA polymerase 0.125 ไมโครลิตร, DNA template 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่อง PCR โดยมีเงื่อนไข การทำ PCR ดังนี้ เริ่มต้นด้วยอุณหภูมิ 94°C นาน 4 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94°C นาน 30 วินาที 55°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 72°C นาน 10 นาที 1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 4% agarose gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ ย้อมด้วย Ethidium bromide เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ DNA ภายใต้เครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

1. ลักษณะทางคุณภาพ ประเมินความหลากหลายภายในประชากรโดยนำลักษณะทางคุณภาพ 14 ลักษณะไปแบ่งตามกลุ่มตามชนิดลักษณะที่พบแตกต่างกันไป และประเมินความหลากหลายภายในและระหว่างประชากรโดยใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon's Index (H') โดยคำนวณจากสูตร (Shannon and Weaver, 1949 อ้างโดย Coffey, 2002)

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

s = จำนวนชนิดที่พบ

pi = สัดส่วนของชนิดนั้นต่อจำนวนทั้งหมด

ในการพิจารณาหากพบค่าดัชนีความหลากหลาย (H') = 0 หมายถึงว่าทุกต้นในประชากรเหมือนกันหมด ไม่มีความหลากหลายภายในประชากร และค่า H' สูงหมายถึงมีความหลากหลายภายในประชากรสูง

2. ลักษณะทางปริมาณ นำไปคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ผลหาช่วงของการกระจายตัว (range) ความแปรปรวน (variance) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV,%)

3. ในระดับโมเลกุลพิจารณารูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละต้น เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์คัดจากศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี 1 พิษณุโลก 2 และชัยนาท 80 พันธุ์คัดจากกรมวิชาการเกษตร และแถบดีเอ็นเอของข้าวป่าสามัญ (*O. rufipogon* Giff.) ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติจากจังหวัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กาญจนบุรี เพื่อคำนวนหาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อพันธุกรรมข้าวป่าภายในข้าวปลูกของเกษตรกร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved