บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษานี้ประกอบด้วยการทดลอง 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1.การสร้างพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

การทดลองที่ 2. การประเมินลักษณะลูกผสมชั่วที่ 1 และ 2

การตรวจสอบพันธุกรรมลูกผสมต้น F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

การศึกษาลักษณะการตอบสนองต่อช่วงแสงในการออกดอก

วิเคราะห์หาปริมาณโปรแอนโทไซยานิน ของเมล็ด F_2

การทดลองที่ 1 การสร้างพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

1.1 พันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

การคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่

1) พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ (female parent) ได้แก่ สายพันธุ์ก้าวหน้าข้าวเจ้าก่ำลูกผสมชั่วที่ 8 (F_8) ระหว่าง ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ (KDML) 105 x ข้าวก่ำดอยสะเก็ด (Kum Doi Saket) ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวก่ำดอยสะเก็ดโดยคัดเลือกเฉพาะประชากรลูกผสมที่มีปริมาณอะไมโลสสูง 17-19 เปอร์เซ็นต์ แต่สายพันธุ์ดังกล่าวจัดเป็นข้าวที่มีความไวต่อช่วงแสง จำนวน 14 สายพันธุ์คือ 107:-42, -44, -46, -52, -68, -72, -73 และ 173:-1,-2, -4, -16, -17, 48, -52)

2) พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อเป็น donor male parent สำหรับลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง ได้แก่ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 (PTT1) เป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงจะใช้เป็นแหล่งพันธุกรรม เพื่อถ่ายทอดลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง

1.2 การสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

ฤดูปลูกที่1 เดือน กรกฎาคม – พฤศจิกายน ปี 2552 เพื่อศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะไม่ไว่ต่อช่วงแสงจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 (PTT1; donor male parent) ให้กับสายพันธุ์ก้าวหน้าข้าวเจ้าก่ำลูกผสม F_8 ที่คัดเลือกไว้ โดยทำการเพาะเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์ ลงในกระถาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ละ 2 กระถาง ๆ ละ 5 ต้น ทำการปลูกทั้งหมด 6 ครั้ง มีระยะห่างกันครั้งละ 10 วันเพื่อให้แต่ละคู่ผสมกันได้พอดีเมื่อถึงระยะออกดอกทำการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวก่ำเจ้าดอยสะเก็ด และข้าวหอมปทุมธานี 1 เก็บเมล็ดลูก F_1 ได้คู่ผสมจำนวน 14 คู่ แยกเก็บเมล็ด F_1 แต่ละคู่เพื่อปลูกประเมินการแสดงออกของยีนควบคุมการถ่ายทอดทางพันธุกรรมใน F_1 และ F_2 ต่อไป (ภาพที่ 3.1)

การทดลองที่ 2. การประเมินลักษณะลูกผสมชั่วที่ 1 และ 2

2.1 การตรวจสอบพันธุกรรมลูกผสมต้น F_1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

1. พิสูจน์ความเป็นลูกผสม F_1 ได้เก็บตัวอย่างใบโดยของต้น F_1 derived lines โดยเก็บตัวอย่างใบแยกต้นๆ ละ 2-3 ใบ จำนวนประชากรละ 5 ต้น พับใส่ถุงกระดาษเก็บตัวอย่าง ทำให้ตัวอย่างใบข้าวแห้ง โดยนำถุงเก็บตัวอย่างที่บรรจุตัวอย่างใบข้าวใส่ในภาชนะปิดที่มี silica gel เป็นตัวดูดความชื้น หลังจากแห้งแล้วเก็บตัวอย่างใบในถุงปิดผนึกและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นำไปพิสูจน์โดยใช้วิธีการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล microsatellite

2. ตรวจสอบพันธุกรรมลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล microsatellite

นำตัวอย่างใบข้าวลูกผสมต้น F_1 ทั้งหมดที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด โดยแยกแต่ละตัวอย่างตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ บดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (Panaud *et al*., 1996) ดังนี้

การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบข้าวที่บดแล้วใส่ eppendorf tube จากนั้นใส่ extraction buffer ประกอบไปด้วย deionized water, 4เปอร์เซ็นต์ CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 20mM EDTA (pH 8), 1.4 M NaCl และ 0.4เปอร์เซ็นต์ β-mercaptoethanol นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาละลายด้วย TE buffer และทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis 1.2เปอร์เซ็นต์ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยอาศัยเทคนิค microsatellite markers

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Panaud *et al*., 1996) โดยใช้ microsatellite primers จำนวน 1 ตำแหน่ง ซึ่ง primer ที่ใช้มีการรายงานว่ามี polymorphism ในข้าวปลูก *O. sativa* L. โดย primers มีลำดับเบสดังนี้ (www.gramene.org)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 รายละเอียดที่สำคัญของ primers ที่ใช้ในการศึกษา

Primer	ชุดซ้ำ	อุณหภูมิ annealing	chromosome no.	ลำดับเบส
RM206	(CT)21	55	11	F: CCCATGCGTTTAACTATTCT R: CGTTCCATCGATCCGTATGG

F; Forward Primer R; Reverse Primer

เติมสารผสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร (µl) ต่อ 1 หลอด ซึ่งประกอบไปด้วย deionized water 16 µl, 10X buffer 2 µl, 50 mM$MgCl_2$ 1 µl, 25 mMdNTP 0.16 µl, primer 0.2 µl, 5 unit Taq DNA Polymerases 0.1 µl, DNA template 1 µl ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 2 มิลลิลิตร (ml) นำเข้าเครื่อง PCR

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 10เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้อง digital เพื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอใช้ข้าวปลูก 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ขาวปทุมธานี 1 (PTT 1) นำมาจากเมล็ดพันธุ์หลัก และสายพันธุ์ก้าวหน้าข้าวเจ้าก่ำลูกผสมชั่วที่ 8 (F_8) เป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ

การศึกษาลักษณะการตอบสนองต่อช่วงแสงในการออกดอก

การประเมินการตอบสนองต่อช่วงแสง ของลูกผสมชั่วที่ 1

ฤดูปลูกที่ 2 วันที่ 1 เดือนเมษายน ปี 2553 ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 โดยการนำเมล็ดลูกชั่วที่ 1 (F_1) ทั้ง 14 คู่ผสมมาเพาะเมล็ดในจานแก้วเพาะฝาปิด (Petri dish) เมื่อเมล็ดงอกมีอายุต้นกล้าได้ 7 วัน ทำการย้ายปลูกในกระถาง (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตรใส่ดินนาให้เกือบเต็มกระถาง) โดยปลูกพันธุ์พ่อแม่จำนวน 15 พันธุ์ๆ ละ 1 กระถาง (เพื่อใช้เปรียบเทียบวันออกดอก) และปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 14 คู่ๆ ผสมละ 3 กระถางๆ (3ซ้ำ) ละ 5 ต้น แผนการทดลองการทดลองแบบ Completely

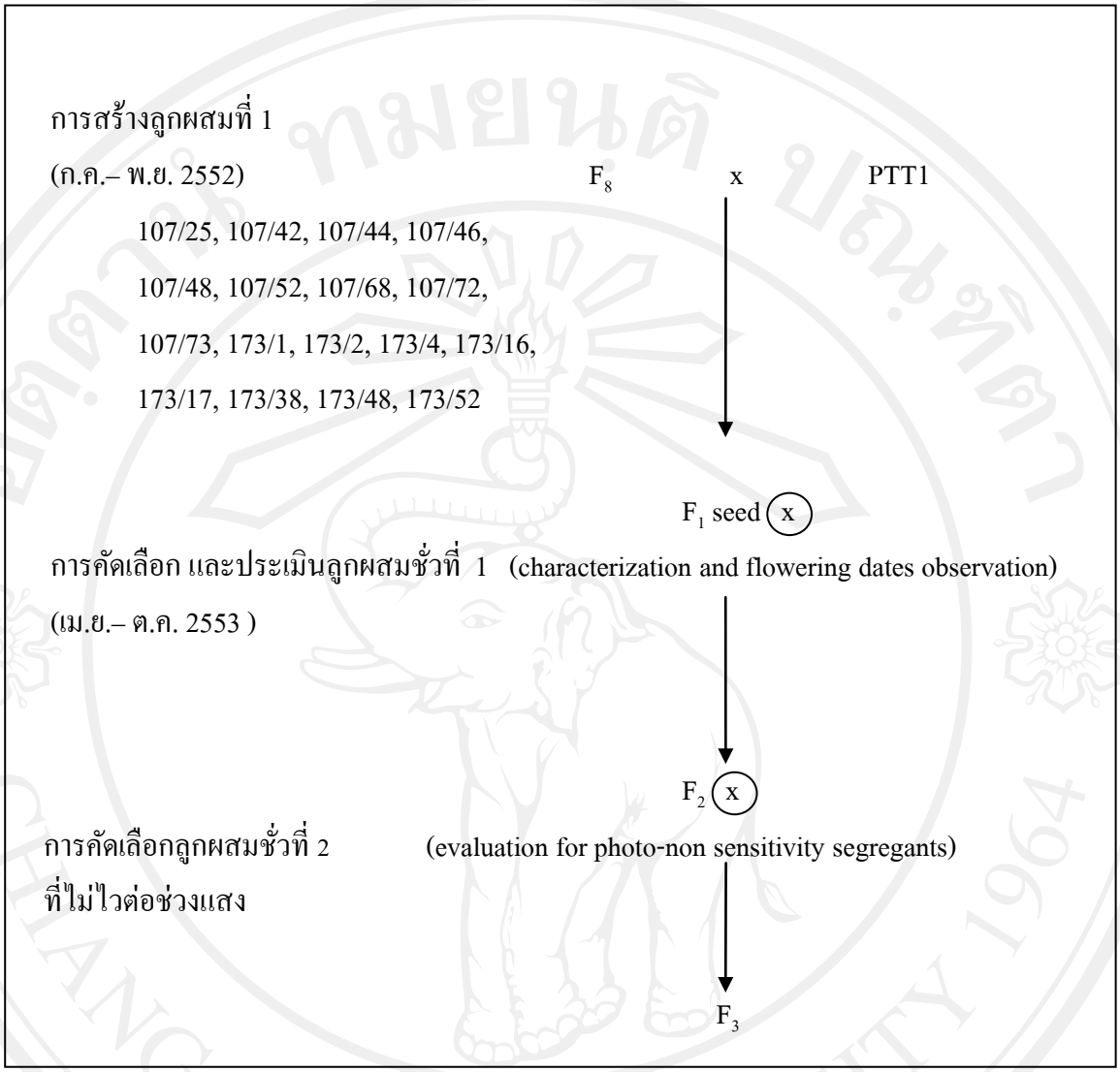
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Randomized Design ปล่อยให้ข้าวผสมตัวเอง (ทำการจดบันทึกอายุวันออกดอก) เมื่อแก่เก็บเกี่ยวเมล็ด F_1 derived line โดยเก็บแยกกันในแต่ละต้น ประเมินลักษณะการตอบสนองต่อช่วงแสง โดยถือเอาต้นที่ดอกบาน (heading) ก่อน 150 วันเป็นต้นไม่ไวแสง (ประภา, 2537) จากนั้นสุ่มแต่ละประชากรมา 1,500 เมล็ดให้เป็นตัวแทนของเมล็ด F_2

การประเมินการตอบสนองต่อช่วงแสงและการคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 2

ฤดูปลูกที่ 3 ทำการปลูกวันที่ 28 มกราคม พ.ศ.2554 โดยปลูกเมล็ดลูกผสม F_2 เพื่อประเมินต้น F_2 ของทั้ง 14 คู่ผสมคู่ละ 1368 ต้น โดยทำการเพาะเมล็ดเมื่อวันที่ 22 เดือนมกราคม 2554 ในกระถางและย้ายปลูกในแปลงนาทดลองโดยปลูก 1 ต้น/หลุม เมื่อวันที่ 22 กุมภาพันธุ์ 2554 พร้อมกับพันธุ์เปรียบเทียบ คือพันธุ์พ่อและแม่ จากนั้นทำการประเมินการบานดอกเพื่อแยกแยะ และบันทึกต้นชั่วที่ 2 ระหว่างต้นไวแสง และไม่ไวแสงของต้นข้าวที่ปลูกในสภาพวันยาว ทดสอบหาอัตราส่วน ฟีโนไทป์ ระหว่างต้นข้าวที่ไวแสงและไม่ไวแสง เพื่อตรวจหาลักษณะพฤติกรรมของยีน (gene behavior) โดยใช้ chi-square test ตามวิธีของ Gardner (1974)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.1 แผนผังการสร้างลูกผสม

ประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของสายพันธุ์ลูกผสม ตามแบบบันทึก Descriptors for Rice ของ IRRI (1980) โดยบันทึกข้อมูลดังนี้

1.ระยะแตกกอเต็มที่ 7 ลักษณะ ได้แก่ การมีขนบ่นแผ่นใบ สีกาบใบ สีแผ่นใบ สีเยื่อกันน้ำฝน รูปร่างเยื่อกันน้ำฝน สีเขี้ยวใบ และสีข้อต่อใบ

2. ระยะออกดอก 6 ลักษณะ ได้แก่ สีปล้อง ทรงกอ จำนวนวันตกกล้าถึงออกดอก 50 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อข้าวลูกผสมออกดอกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละประชากรบันทึกวันออกดอกโดยเก็บข้อมูลจากการสังเกตจำนวนต้นข้าวออกดอกมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นข้าวทั้งหมดในแปลง และแต่ละต้นต้องมีช่อดอกแรกบาน ½ ของช่อ) สียอดดอก สียอดเกสรตัวเมีย สีกลีบรองดอก สีของหางและการมีหาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ระยะออกรวงแล้ว 20 วัน 7 ลักษณะ ได้แก่ ความสูงลำต้น จำนวนหน่อต่อกอ จำนวนรวงต่อกอ ลักษณะรวง การยืดคอรวง ลักษณะก้านรวง และการแตกระแง้

5. ระยะเก็บเกี่ยว 2 ลักษณะ ได้แก่ การแก่ของใบ และความยาวรวง

6. ระยะหลังเก็บเกี่ยว 11 ลักษณะ ได้แก่ การมีขนบนเปลือกเมล็ด สีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ด น้ำหนัก 100 เมล็ด ความยาวของเมล็ดข้าวกล้อง ความกว้างของเมล็ดข้าวกล้อง อัตราส่วนความกว้างต่อความยาวเมล็ด จำนวนเมล็ดดี เมล็ดลีบ เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี

วิเคราะห์หาปริมาณโปรแอนโทไซยานิน ของเมล็ด F_2

หาปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวกล้องของแต่ละสายพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยนำเมล็ดที่เกิดจากต้นลูกผสมชั่วที่ 1 (เมล็ด F_2) แต่ละสายพันธุ์มารวมกัน ในลูกผสมชั่วนี้ยังไม่เกิดการกระจายตัวของลักษณะการตอบสนองต่อช่วงแสง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน ส่วนเมล็ดที่เกิดจากต้นลูกผสมชั่วที่ 2 (เมล็ด F_3) มีกระจายตัวของลักษณะการตอบสนองต่อช่วงแสงเกิดขึ้นแล้ว จึงทำการคัดเลือกต้นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงมาสายพันธุ์ละ 20 ต้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยทำการศึกษาแต่ละต้น (Individual plant) โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Abdel-Aal and Hucl (1998)

วิธีการทดลอง

1 บดเมล็ดข้าวกล้อง และชั่งข้าวที่บดได้ จำนวน 3 กรัม ใส่ใน centrifuge tube ขนาดความจุ 50 มิลลิลิตร

2 เติม acidified ethanol (ethanol และ HCl 1 N 85:15 v/v) ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงไปในข้อ 1 แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่า 30 นาที หลังจากเขย่า 15 นาที ถ้า pH มีการเปลี่ยนแปลงต้องปรับ pH ให้เป็น 1 ด้วย 4 N HCl หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 27,200 g เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายที่สกัดได้ในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาณด้วย acidified ethanol เป็น 50 มิลลิลิตร

3.วัดความเข้มของสีของสารละลาย ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยอ่านค่าเป็น absorbance ที่ความยาวคลื่นแสง 535 นาโนเมตร หลังปรับเครื่องด้วยblank ให้ได้ค่า absorbance เป็น 0

4.นำ absorbance ไปหาปริมาณแอนโทไซยานิน โดยคำนวณตามสมการดังนี้

$$C = (A/B \times (vol/1{,}000) \times MW \times (1/sample\ wt) \times 10^6$$

$$C = A \times 288.21\ mg/kg$$

เมื่อ C = concentration of total anthocyanin (mg/kg)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

B = molar absorptivity (Cyanidin -3- glucoside = 25,965 cm^{-1} M^{-1})

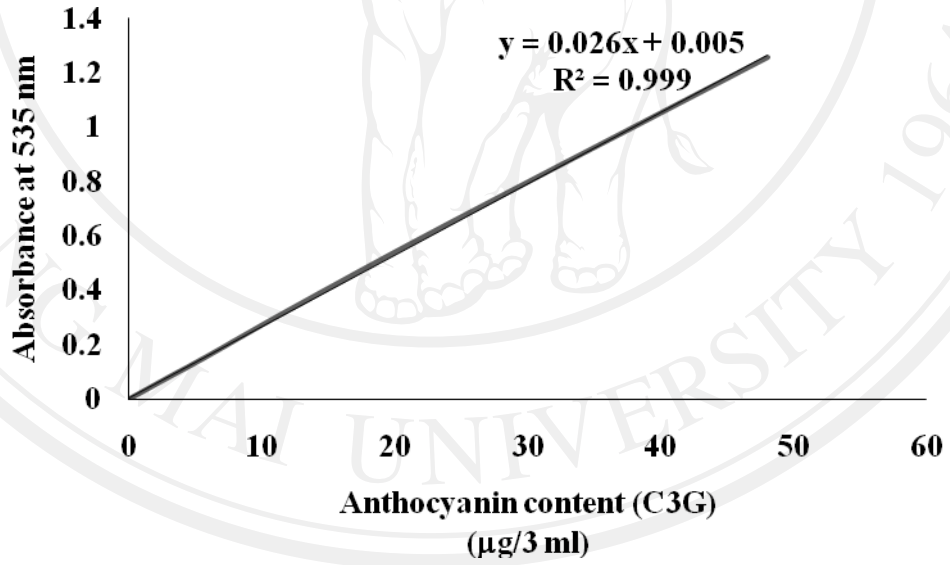
vol = total volume of anthocyanin extract

MW = molecular weight (Cyanidin -3- glucoside = 449)

A = ค่า absorbance

4.2.5 วิธีทำกราฟมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Cyanidin -3- glucoside ความเข้มข้น 0 – 48 ไมโครกรัม ใน acidified ethanol 3 มิลลิลิตร
2. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer หลังปรับเครื่องด้วย blank อ่านค่า absorbance เป็น 0
3. นำค่า absorbance กับความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานมาเขียนเป็นเส้นกราฟมาตรฐาน ได้ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพ 3.2 เส้นกราฟมาตรฐานของabsorbance กับความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน

ส่วนการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของลักษณะลำต้นและใบทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของแต่ละข้อมูลโดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ปทุมธานี 1 และสายพันธุ์ก้าวหน้าข้าวเจ้าก่ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) $P< 0.05$ (Gomez and Gomez, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ และระยะเวลาในการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

1. งานวิจัยด้านผสมพันธุ์ข้าว ทำการทดลองที่โรงเรือนคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. งานวิจัยด้านการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม โดยทำการทดลอง ณ แปลงทดลอง สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. งานวิจัยทางด้านโมเลกุล ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการโมเลกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 2 ปี 6 เดือน โดยเริ่มตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2552 ถึงเดือน ธันวาคม 2554

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved