# บทที่ 3
# วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้เก็บรวบรวมข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองจากเกษตรกรบ้านอาโยะใหม่ใหม่จำนวน 40 ประชากร (population) ที่มีชื่อพันธุ์เหมือนและแตกต่างกัน 11 ชื่อพันธุ์ ซึ่งเป็นชาวเขาเผ่าอาข่าที่อยู่บนดอยแม่สลอง ต.แม่สลองใน อ.แม่ฟ้าหลวง จ. เชียงราย

**เมล็ดพันธุ์ข้าว**

รายชื่อพันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองจากเกษตรกรบ้านอาโยะใหม่จำนวน 11 ชื่อพันธุ์ 40 ประชากร

| | |
|---|---|
| 1. คาเจะ (KJ 1 – KJ 8) | จำนวน 8 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 2. จะเด่ (JD 1 – JD 8) | จำนวน 8 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 3. แชะซะ (CC 1 – CC 6) | จำนวน 6 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 4. แชะนะ (CN 1 - CN 6) | จำนวน 6 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 5. ข่าจู (KG) | จำนวน 1 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 6. แชเกอะ (SK) | จำนวน 1 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 7. แชะเจ่ (CJ) | จำนวน 1 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 8. จ่าบึ (JB) | จำนวน 1 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 9. แชปะห่าดั้ง (SPHD) | จำนวน 1 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 10. ไม่มีชื่อเรียก (Unnamed) | จำนวน 1 ประชากร ปลูกแบบข้าวไร่ |
| 11. แชเอาะ (SO 1 – SO 6) | จำนวน 6 ประชากร ปลูกแบบข้าวนา |

**วิธีการทดลอง**

**การทดลองที่ 1 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในลักษณะเมล็ดที่ได้จากเกษตรกร**

ลักษณะเมล็ดที่นำมาใช้ในการประเมินจำนวน 14 ลักษณะได้แก่ สีเปลือกเมล็ด การมีขนบนเมล็ดข้าวเปลือก น้ำหนัก 1,000 เมล็ด ความกว้าง ความยาว ความหนา และรูปร่างของเมล็ด สี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เยื่อหุ้มเมล็ด ชนิดของข้าวสาร สียอดเมล็ด สีกลีบรองเมล็ด ความยาวกลีบรองเมล็ด หางข้าวและสีหางข้าว โดยประเมินจากเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากเกษตรกรประชากรละ 100 เมล็ด

**การทดลองที่ 2 การทดสอบในรุ่นลูก (Progeny test)**

**2.1 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานและสรีระ**

นำข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองจากเกษตรกรบ้านอาโยะใหม่จำนวน 25 ประชากร มาปลูกในกระถาง โดยปลูกตัวอย่างละ 20 ต้นในฤดูฝนปี 2550โดยปลูก 1 ต้นต่อหลุมบันทึกข้อมูลลักษณะแยกแต่ละต้นทุกต้นในระยะต่างๆ โดยแบ่งเป็น

ลักษณะทางสัณฐานที่ใช้ในการประเมินจำนวน 26 ลักษณะดังนี้

ระยะแตกกอได้แก่ สีแผ่นใบ สีกาบใบ สีข้อต่อใบ สีข้อ สีปล้อง การมีขนบนแผ่นใบ มุมของยอดแผ่นใบ สีเขี้ยวกันแมลง สีเยื่อกันน้ำฝน รูปร่างเยื่อกันน้ำฝน

ระยะออกดอกได้แก่ ทรงกอ มุมของใบธง สียอดเกสรตัวเมีย สียอดดอก สีกลีบรองดอก ความยาวกลีบรองดอก หางข้าว สีของหางข้าว การชูรวง

ระยะเก็บเกี่ยวได้แก่ ก้านของรวง การติดเมล็ด การแห้งของใบธง การร่วงของเมล็ด การนวด สีเปลือกเมล็ดและการมีขนของเปลือกเมล็ด

ลักษณะทางสรีระที่ใช้ในการประเมินจำนวน 12 ลักษณะดังนี้

ระยะแตกกอได้แก่ ความยาวของใบ ความกว้างของใบ ความยาวของเยื่อกันน้ำฝน

ระยะออกดอกได้แก่ อายุออกดอก ความยาวของลำต้น จำนวนหน่อต่อต้น เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น

ระยะเก็บเกี่ยวได้แก่ ความยาวรวง อายุเก็บเกี่ยว จำนวนรวงต่อต้น จำนวนระแง้ต่อรวง และเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี

**2.2 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลด้วยเครื่องหมายโมเลกุล microsatellites**

นำเมล็ดข้าวจากเกษตรกรจำนวน 15 ประชากร มาปลูกและเก็บตัวอย่างใบข้าวของแต่ละตัวอย่างแยกต้น ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Xie *et al.* (1999) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลอง โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดย microsatellite primer ที่ใช้ในการทดลองนี้มีจำนวน 4 primer คือ RM1, RM44, RM219 และ RM241 นำ PCR product ที่ได้ไปแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอ (band) โดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน 10% polyacrylamide gel นำเจลที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไปย้อมด้วยสาร ethidium bromide จากนั้นนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาลอยด์

นำข้อมูลระดับโมเลกุลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่าง โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแทนด้วย 1 และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในแถวเดียวกันแทนด้วย 0 เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยโปรแกรม FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001) และโปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) ในการคำนวณค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) และนำค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมที่ได้มาสร้างแผนผังความสัมพันธ์ (Phylogenic dendrogram) ตามวิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means) โดยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) โดยทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการโมเลกุล ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

**1. การประเมินความหลากหลาย (Estimating a diversity index)**

ตัวชี้วัดความหลากหลายอย่างง่ายๆ และถูกใช้อย่างแพร่หลายคือ Shannon-Weaver index (*H*) โดยคำนวณจากสูตร (Fowler *et al.*, 1998)

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

โดย $s$ = จำนวนชนิดที่พบ

$pi$ = สัดส่วนของชนิดนั้นต่อจำนวนทั้งหมด

นำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานมาวัดความหลากหลายภายใน โดยใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Weaver index (*H*)

**2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Fowler *et al.*, 1998)**

1) ค่าเฉลี่ย (Mean)

$$\overline{X} = \sum x/n$$

2) ค่าขอบเขตข้อมูล (Range) เป็นการวัดความแปรปรวนที่ง่ายที่สุด โดยดูการกระจายตัวของข้อมูลที่ต่ำสุดและสูงสุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation of mean)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

4) สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation) (CV) เป็นการเปรียบเทียบความแปรปรวนของตัวอย่างในประชากรที่มีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

$$CV = (SD/\bar{X}) \times 100$$

**3. การวิเคราะห์ข้อมูลในระดับโมเลกุล (Frankel *et al*., 1995)**

1) Expected heterozygosity or gene diversity (h) (Nei, 1973)

$$h = 1 - \sum p_i^2$$

$p_i$ = ความถี่ของ allele ที่ $i$

2) Genetic diversity within populations (Hs) เป็นค่า average heterozygosity ระหว่างต้นพืชที่มีการผสมพันธุ์กันโดยอิสระภายใน subpopulation ต่างๆ

3) Genetic diversity for all populations (Ht) เป็นค่า average heterozygosity ระหว่างต้นพืชที่มีการผสมพันธุ์กันโดยอิสระภายในพื้นที่ทั้งหมดที่ศึกษา

4) Gene differentiation among subpopulations (Fst) เป็นการวัดความแตกต่างระหว่างประชากร (Wright's Fst หรือ Nei's Gst)

$$Fst = (H_T - H_S)/H_T$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved