บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

การศึกษานี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 เป็นการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดลองที่ 2 เป็นการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิค microsatellites ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.1 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.1.1 พันธุ์ข้าว

ศึกษาข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 21 พันธุ์ ซึ่งเก็บรวบรวมจากเกษตรกรในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังแสดงตารางที่ 3.1

ตาราง 3.1 รายชื่อพันธุ์ข้าวเหนียวก่ำพันธ์พื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าว	แหล่งที่มาของข้าวเหนียวก่ำ	ลักษณะพันธุ์
1	ก่ำ 11875	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
2	ก่ำ 19104	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
3	ก่ำ 19959	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
4	ก่ำ 5153	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
5	ก่ำ 87046	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
6	ก่ำ 89057	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
7	ก่ำ 99151	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
8	ก่ำ 88038	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
9	ก่ำ 88069	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
10	ก่ำ 87090	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
11	ก่ำ 87061	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 (ต่อ) รายชื่อพันธุ์ข้าวเหนียวก่ำพันธ์พื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าว	แหล่งที่มาของข้าวเหนียวก่ำ	ลักษณะพันธุ์
12	ก่ำ 89038	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
13	ก่ำเวียงสา	จังหวัดน่าน	ข้าวนาดำ
14	เหนียวดำก่ำนา	จังหวัดน่าน	ข้าวนาดำ
15	ก่ำน่าน	จังหวัดน่าน	ข้าวไร่
16	ก่ำดอยมูเซอ	จังหวัดเชียงใหม่	ข้าวไร่
17	ก่ำ 7677	จังหวัดเชียงใหม่	ข้าวนาดำ
18	ก่ำอมก๋อย	จังหวัดเชียงใหม่	ข้าวไร่
19	ก่ำเวียดนาม	สาธารณรัฐเวียดนาม	ข้าวนาดำ
20	ก่ำพะเยา	จังหวัดพะเยา	ข้าวนาดำ
21	ก่ำดอยสะเก็ด	พันธุ์ปรับปรุงของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ข้าวนาดำ

และข้าวพันธุ์ปรับปรุงจำนวน 3 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 และเหนียวสันป่าตอง เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ และในการทดลองที่ 2 ข้าวพันธุ์ปรับปรุงจำนวน 4 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และกข 6 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

3.1.2. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ปลูกตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำที่เก็บรวบรวมมา และข้าวพันธุ์ปรับปรุงในกระถางจำนวน 10 ต้นต่อกระถาง ปลูกประชากรละ 30 ต้น เมื่อต้นข้าวถึงระยะแตกกอ เก็บตัวอย่างใบอ่อนของแต่ละต้นที่ปลูกในกระถาง เพื่อนำไปวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลต่อไป แล้วบันทึกข้อมูลของลักษณะสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา โดยวัดทั้ง 30 ต้นในระยะต่างๆ ดังนี้

ระยะแตกกอ บันทึกลักษณะทรงกอ สีกาบใบ สีแผ่นใบ สีลิ้นใบ รูปร่างลิ้นใบ สีเขี้ยวใบ จำนวนหน่อต่อต้น

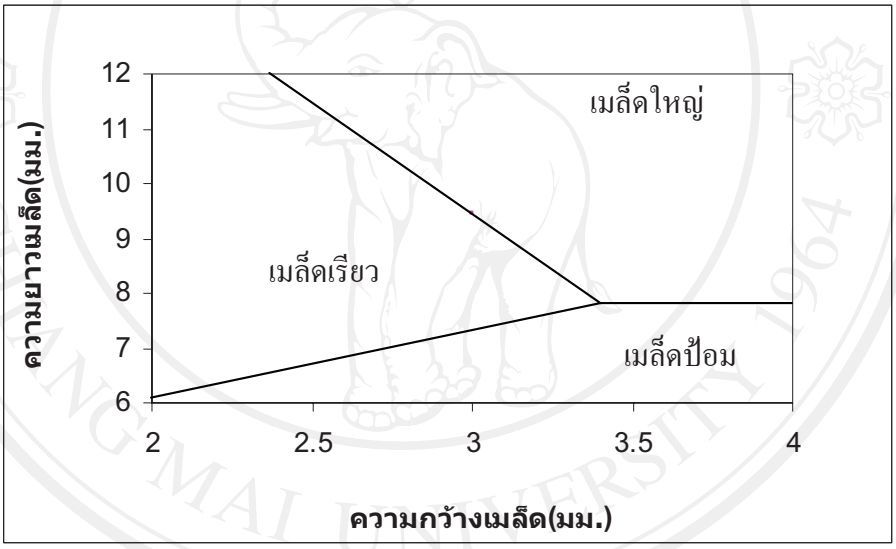
ระยะออกดอก บันทึกวันออกดอก สีข้อ สีปล้อง สียอดดอก สียอดเกสรตัวเมีย สีกลีบรองดอก และการมีหาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระยะเก็บเกี่ยว บันทึกความสูงของต้นและวันเก็บเกี่ยว หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวแยกต้น วัดความกว้าง ความยาวเมล็ด สีเปลือกและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

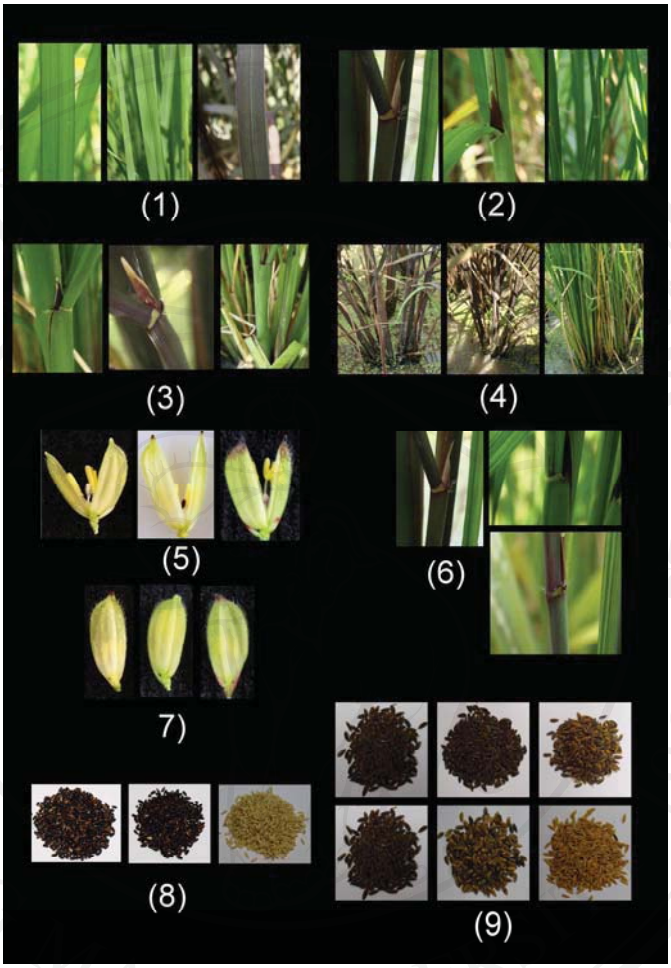
จำแนกลักษณะของสีตามมาตรฐานสีต้นข้าวของ IBPGR-IRRI (1980)

สุ่มตัวอย่างข้าวเพื่อประเมิน พันธุ์ละ100 เมล็ด นำมาวัดขนาดและประเภทของเมล็ด โดยวัดจากสัดส่วนความยาวและความกว้างเมล็ดตามวิธีของ Matsuo (1952) อ้างโดย Oka (1988) (ภาพ 3.1)



ภาพ 3.1 วิธีประเมินประเภทของเมล็ด โดยใช่สัดส่วนขนาดเมล็ดตามวิธีของ Matsuo (1952)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.2 ตัวอย่างภาพของลักษณะคุณภาพที่ใช้ในการประเมิน

(1) = สีแผ่นใบ (2) = สีหูและลิ้นใบ (3) = สีกาบใบ (4) = ทรงกอ

(5) = สีเกสร (6) = สีข้อ (7) = สียอดดอกและกลีบรองดอก

(8) = สีเยื่อหุ้มเมล็ด (9) = สีเปลือกเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ลักษณะทางคุณภาพ ประเมินความหลากหลายภายในประชากรและระหว่างประชากร โดยนำลักษณะทางคุณภาพที่ศึกษาทั้งหมด 14 ลักษณะ แบ่งตามกลุ่มตามชนิดลักษณะที่พบแตกต่างกันไป และประเมินความหลากหลายโดยวัดความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างประชากร โดยใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon's index (H') โดยคำนวณจากสูตร (Fowler *et al*., 1998)

$$H' = -\sum^{S} pi \ln pi$$

โดย pi = สัดส่วนของชนิดนั้นต่อจำนวนทั้งหมด

S = จำนวนชนิดความแตกต่างที่พบในลักษณะบันทึก

การพิจารณาความหลากหลายนี้ หากพบว่า ค่า H' เท่ากับศูนย์ แสดงว่าทุกต้นในตัวอย่างไม่แตกต่างกัน และเมื่อค่า H' มีค่าสูงขึ้นแสดงว่ามีความหลากหลายสูงขึ้น

2.การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าเฉลี่ย (mean) $\overline{X} = \sum x / n$

ค่าขอบเขตข้อมูล (range) เป็นการวัดความแปรปรวนที่ง่ายที่สุด โดยดูการกระจายตัวของข้อมูลที่ต่ำสุดและสูงสุด

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation of mean)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation: CV) เป็นการเปรียบเทียบความแปรปรวนของตัวอย่างในประชากรที่มีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

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

3.2 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิค microsatellites

เมื่อต้นข้าวถึงระยะแตกกอ เก็บตัวอย่างใบอ่อนของแต่ละต้น ที่ปลูกในกระถางเพื่อนำไปทำการสกัด DNA ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Xie *et al*. (1999) นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยอาศัยเทคนิค microsatellite markers นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel electrophoresis นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสาร ethidium bromide และนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาลอยด์เพื่อนำไปวิเคราะห์

ตาราง 3.2 Microsatellites Markers 12 ตำแหน่ง ที่ใช้ประเมินความหลากหลายข้าวเหนียวก่ำในระดับโมเลกุล (McCouch et al. 1997)

Primers	Chro	Forward Primer	Reverse Primer	Anneal Temp.
RM1	1	5¹..GCGAAAACACAATGCAAAAA..3¹	5¹..GCGTTGGTTGGACCTGAC..3¹	55
RM11	7	5¹..TCTCCTCTTCCCCCGATC..3¹	5¹..ATAGCGGGCGAGGCTTAG..3¹	55
RM19	12	5¹..CAAAAACAGAGCAGATGAC..3¹	5¹..CTCAAGATGGACGCCAAGA..3¹	55
RM161	5	5¹..TGCAGATGAGAAGCGGCGCCTC..3¹	5¹..TGTGTCATCAGACGGCGCTCCG..3¹	61
RM279	2	5¹..GCGGGAGAGGGATCTCCT..3¹	5¹..GGCTAGGAGTTAACCTCGCG ..3¹	55
RM171	10	5¹..AACGCGAGGACACGTACTTAC..3¹	5¹..ACGAGATACGTACGCCTTTG..3¹	55
RM149	8	5¹..GCTGACCAACGAACCTAGGCCG..3¹	5¹..GTTGGAAGCCTTTCCTCGTAACACG ..3¹	55
RM287	11	5¹..TTCCCTGTTAAGAGAGAAATC..3¹	5¹..GTGTATTTGGTGAAAGCAAC..3¹	55
RM307	4	5¹..GTACTACCGACCTACCGTTCAC..3¹	5¹..CTGCTATGCATGAACTGCTC..3¹	55
RM316	9	5¹..CTAGTTGGGCATACGATGGC..3¹	5¹..ACGCTTATATGTTACGTCAAC..3¹	55
RM510	6	5¹..AACCGGATTAGTTCTCGCC..3¹	5¹..TGAGGACGACGAGCAGATTC..3¹	55
RM22	3	5¹.. GGTTTGGGAGCCCATAATCT..3¹	5¹.. CTGGGCTTCTTTCACTCGTC ..3¹	55

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1 การวิเคราะห์ข้อมูลในระดับโมเลกุล

นำข้อมูลลักษณะทางสัณฐาน และข้อมูลระดับโมเลกุล มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างโดยวิธี cluster analysis ด้วยโปรแกรม POPGENE (Yeh *et al*., 1999) ในการคำนวณค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) และนำค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมที่ได้มาสร้าง UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) dendrogram โดยโปรแกรม MEGA 2 (Kumar *et al*., 2001) โดยทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการโมเลกุล ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Expected heterozygosity or gene diversity (h)

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

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

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

Gene differentiation among subpopulations (Fst) เป็นการวัดค่าความแตกต่างระหว่างประชากร

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved