บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เมล็ดพันธุ์ข้าว

การทดลองนี้ใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์พื้นเมืองกะเหรี่ยง (ข้าวนาที่สูง) ที่มีชื่อเหมือนกัน คือ บือชอมี (หรือ ข้าวไก่ป่า) จำนวน 22 ตัวอย่างพันธุ์ โดยรวบรวมจากเกษตรกรหมู่บ้านต่างกันและในหมู่บ้านเดียวกันหรือใกล้เคียงกันในจังหวัดเชียงใหม่ โดยมีจำนวนและรหัสตัวอย่างพันธุ์ ดังนี้

1. บ้านห้วยอีค่าง อ. แม่วาง จำนวน 14 ตัวอย่าง (HEC 1 – HEC 14)
2. บ้านหนองเต่า อ. แม่วาง จำนวน 3 ตัวอย่าง (NT 1 – NT 3)
3. บ้านดอกแดง อ. ฮอด จำนวน 1 ตัวอย่าง (DD)
4. บ้านแม่โถหลวง อ. ฮอด จำนวน 1 ตัวอย่าง (MTH)
5. บ้านแม่ลานคำ อ. สะเมิง จำนวน 3 ตัวอย่าง (MLC 1 – MLC 3)

3.2 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะเมล็ดที่ได้จากเกษตรกร

ลักษณะเมล็ดที่นำมาใช้ในการประเมิน ได้แก่ สีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ด ชนิดข้าวสาร (หาชนิดแป้งในเมล็ดโดยการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน; KI/I_2 อัตรา 1 กรัม: น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) น้ำหนัก 100 เมล็ด ความกว้างของเมล็ดข้าวเปลือก ความยาวของเมล็ดข้าวเปลือก ความหนาของเมล็ดข้าวเปลือก และรูปร่างเมล็ดข้าวเปลือก โดยประเมินจากเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากเกษตรกร

3.3 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา

การทดลองประกอบด้วย 3 ฤดูปลูก แต่ละฤดูปลูกใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวบือชอมีจำนวน 22 ตัวอย่างพันธุ์ โดยแบ่งฤดูปลูกเป็นดังนี้

1. ฤดูแล้ง ทดลองในกระถาง

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยทดลองในกระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ปลูกข้าวบือชอมีแต่ละตัวอย่างพันธุ์แบบหยอดเมล็ด จำนวน 1 ต้นต่อหลุม 7 ต้นต่อกระถาง จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกลักษณะแยกแต่ละต้นทุกต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ฤดูฝน ทดลองในกระถาง

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยทดลองในกระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ปลูกข้าวบือชอมีแต่ละตัวอย่างพันธุ์แบบหยอดเมล็ด จำนวน 1 ต้นต่อหลุม 5 ต้นต่อกระถาง จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกลักษณะแยกแต่ละต้นทุกต้น และเก็บตัวอย่างใบของแต่ละตัวอย่างพันธุ์แยกต้นทุกต้นเพื่อนำไปใช้ในงานทดลองการวัดความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล

3. ฤดูฝน ทดลองในแปลง

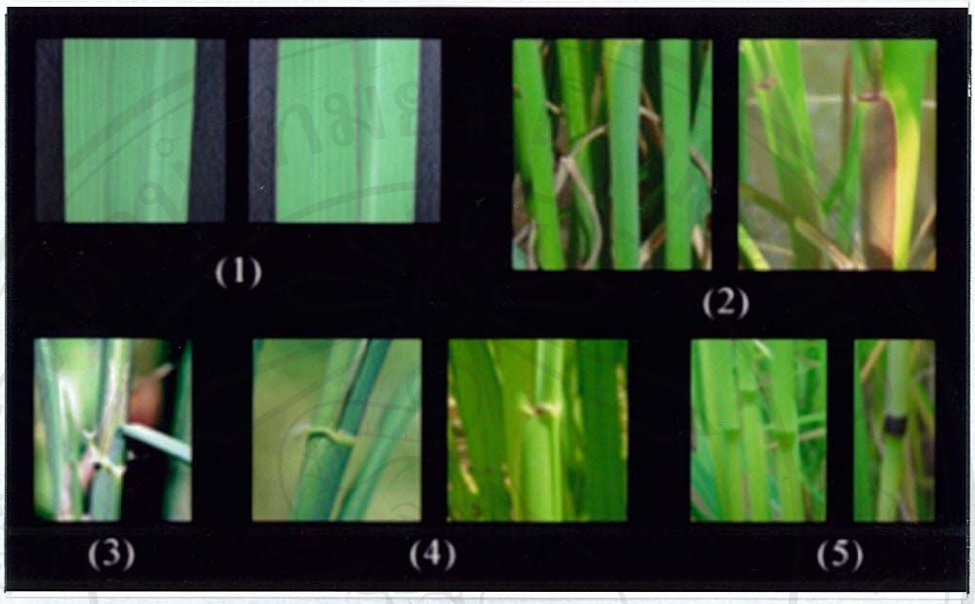
วางแผนการทดลองแบบ randomized completed block design (RCB) โดยทดลองที่แปลงทดลองภาควิชาพืชไร่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำเมล็ดพันธุ์ข้าวบือชอมีแต่ละตัวอย่างพันธุ์มาปลูกเพาะกล้าโดยการหว่านเมล็ดในกระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร เมื่อต้นกล้าอายุ 25-30 วัน ย้ายปักดำในแปลง แต่ละตัวอย่างพันธุ์ปักดำ 1 ต้นต่อหลุม 4 แถว แถวละ 12 ต้น บันทึกลักษณะแยกแต่ละต้น 20 ต้น จำนวน 2 ซ้ำ

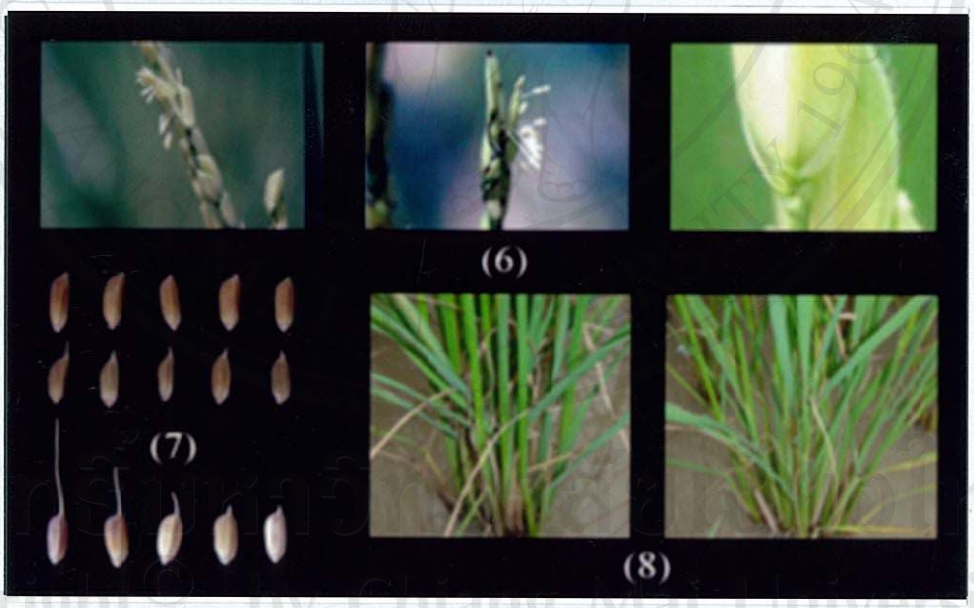
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่ใช้ในการประเมิน (IRRI-IBPRG, 1980) แบ่งเป็น

ลักษณะทางคุณภาพจำนวน 14 ลักษณะ ได้แก่ สีแผ่นใบ สีกาบใบ สีลิ้นใบ รูปร่างลิ้นใบ สีหูใบ สีข้อ สีข้อต่อใบ สีปล้อง สียอดเกสรตัวเมีย สียอดดอก สีกลีบรองดอก หางข้าว สีของหางข้าว และทรงกอ

ลักษณะทางปริมาณจำนวน 10 ลักษณะ ได้แก่ อายุออกดอก (วันหลังงอก) ความสูงที่ระยะเก็บเกี่ยว (เซนติเมตร) จำนวนหน่อต่อต้น จำนวนรวงต่อต้น ความยาวรวง (เซนติเมตร) จำนวนดอกต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี เปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบ เปอร์เซ็นต์เมล็ดร่วง และจำนวนระแง้ต่อรวง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved





ภาพ 1 ตัวอย่างภาพของลักษณะทางคุณภาพที่ใช้ในการประเมิน โดย (1) = สีแผ่นใบ (2) = สีกาบใบ (3) = สีลิ้นใบและรูปร่างลิ้นใบ (4) = สีหูใบและสีข้อต่อใบ (5) = สีข้อและสีปล้อง (6) = สียอดเกสรตัวเมีย สียอดดอก และสีกลีบรองดอก (7) = หางข้าวและสีหางข้าว (8) = ทรงกอ (ภาพทั้งหมดไม่ได้อยู่ในมาตราส่วนเดียวกัน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะที่น่าจะเป็นประโยชน์

3.4.1 ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้อง

วิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดโดยใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าวบือชอมีที่เก็บเป็นเมล็ดรวมของแต่ละตัวอย่างพันธุ์ที่ปลูกฤดูฝน ทดลองในแปลง แยกเมล็ดลีบทิ้ง แล้วนำเมล็ดดีที่ได้มาแกะเปลือกออกโดยใช้มือแกะ นำเมล็ดที่แกะเปลือกออกแล้วเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่างเมล็ดข้าวที่อบแล้ว 1 กรัมใส่ใน crucible ตัวอย่างพันธุ์ละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ให้ขี้เถ้าเป็นสีเทา-น้ำตาล แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำตัวอย่างที่ได้มาย่อยด้วยสารละลายผสมของ HCL: deionize water อัตรา 1: 1 ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วล้างด้วย deionize water นำ crucible ที่ใส่สารละลายวางบน hot pan ที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างสารละลายตัวอย่างที่ได้ใส่ในหลอดทดลองด้วย deionize water ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 นำสารละลายที่กรองได้ไปอ่านผลปริมาณธาตุเหล็กด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Delhaize *et al.*, 1984) นำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นของธาตุเหล็กในเมล็ดโดยคำนวณกลับจากน้ำหนักที่ชั่งก่อนเผา และปริมาตรที่ปรับเป็น 10 มิลลิลิตร ดังสูตร

$$\text{Fe (ppm)} = \frac{10\ (\text{ml})}{\text{Wt (g)}} \times (\text{read})$$

โดย 10 = ปริมาตรของสารละลายในแต่ละหลอดทดลอง (มิลลิลิตร)

wt = น้ำหนักของตัวอย่างเมล็ดข้าวในแต่ละ crucible (กรัม)

read = ค่าที่อ่านได้ conc (ppm)

3.4.2 ค่าการสลายเมล็ดข้าวในด่าง

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวบือชอมีที่เก็บเป็นเมล็ดรวมของแต่ละตัวอย่างพันธุ์ที่ปลูกฤดูฝน ทดลองในแปลง แยกเมล็ดลีบทิ้ง แล้วนำเมล็ดดีที่ได้มาสีและขัดขาวเพื่อใช้ในการทดสอบ

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่ง ที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.0001 กรัม
2. ตู้อบ
3. ขวดแก้วปริมาตร (volumetric flask) ขนาดความจุ 500, 1000 และ 2,000 มิลลิลิตร
4. จานแก้วพร้อมฝาปิด (petri disk) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. บีกเกอร์แก้ว (beaker) ขนาด 200 และ 600 มิลลิลิตร
6. โถดูดความชื้น (disiccator)
7. ขวดแก้วรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
8. กระบอกตวง (cylender) ขนาด 50 มิลลิลิตร
9. คีมคีบ (forcep)

สารเคมี

1. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide : KOH) 85%
2. โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท (potassium hydrogen phthalate : $C_8H_5KO_4$)
3. ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein : $C_{20}H_{14}O_4$)

การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.7 ± 0.05%

1. เตรียม stock solution โดยชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 588.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มให้เดือดแล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution สำหรับเจือจางเป็น working solution ที่ใช้ในงานทดลองต่อไป

2. นำ stock solution ที่เตรียมไว้ปริมาตร 33 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็น working solution

การหาความเข้มข้นของสารละลาย working solution

1. อบสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทที่อุณหภูมิ 100 – 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. ชั่งสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทที่ได้ประมาณ 0.5000 กรัม โดยอ่านให้ได้น้ำหนักที่แท้จริง

3. ละลายสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทที่ชั่งได้ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเข้มข้น 1% ลงไป 3 หยด เพื่อเป็น indicater แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลาย working solution จนสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของ working solution ที่ใช้ไปเป็นมิลลิลิตร

4. ทำ blank วิธีเดียวกับข้อ 3 โดยไม่ใส่สารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลาย working solution จนสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของ working solution ที่ใช้ไปเป็นมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. คำนวณหาความเข้มข้นของ working solution ตามสูตร ดังนี้

$$\% \text{ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์} = \frac{P}{204.23} \times \frac{56.109}{V - B} \times 100$$

โดย P = น้ำหนักของสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท (กรัม)

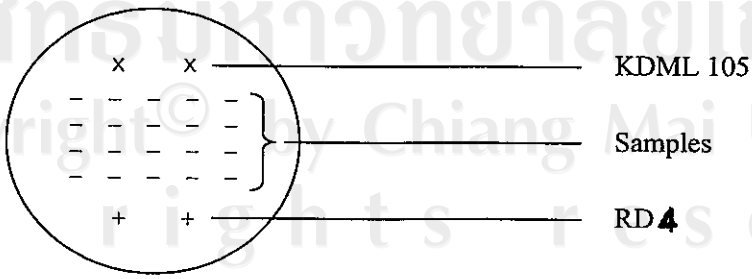
V = ปริมาตรของ working solution ที่ใช้ในการไทเทรตกับโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของ working solution ที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองนี้ดัดแปลงจากวิธีของ งามชื่น (2545), Juliano and Villareal (1993) และ IRRI (1985)

1. สุ่มเมล็ดข้าวเต็มเมล็ดที่ผ่านการสีและขัดขาวแล้วตัวอย่างพันธุ์ละ 100 เมล็ด เรียงใส่ในจานแก้วใสจำนวน 5 จาน จานละ 20 เมล็ด โดยให้แต่ละเมล็ดอยู่ห่างกันพอสมควร และเรียงเมล็ดข้าวที่เป็นตัว check ที่มีค่าการสลายตัวในด่างสูงคือ ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) เรียงไว้ด้านบนจำนวน 2 เมล็ด และเมล็ดข้าวที่มีค่าการสลายตัวในด่างต่ำคือ กข 4 (RD 4) เรียงไว้ด้านล่างจำนวน 2 เมล็ด ดังภาพ 1 เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ ก่อนเรียงควรจุ่มเมล็ดข้าวในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เจือจาง (working solution) เพื่อป้องกันไม่ให้เมล็ดข้าวลอยและเลื่อนออกจากตำแหน่งที่เรียงไว้ แล้ววางจานแก้วใสบนพื้นราบสีดำ



ภาพ 2 การเรียงตัวอย่างเมล็ดข้าว และ ตัว check ที่ใช้เปรียบเทียบในการพิจารณาระดับการสลายเมล็ดข้าวในด่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เจือจาง (working solution) ที่เตรียมไว้ลงในจานแก้วใสที่เรียงตัวอย่างเมล็ดข้าวเสร็จแล้ว ประมาณจานละ 50 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ขยับเขยื้อนเป็นเวลา 23 ชั่วโมง

3. พิจารณาระดับการสลายเมล็ดข้าวในด่างแต่ละเมล็ดตามลักษณะการสลายในตาราง 2

4. การวินิจฉัยคือ ข้าวที่มีระดับการสลายตัวในด่างระดับ 1 – 3 จะมีลักษณะแข็งหลังจากทิ้งไว้ให้เย็นหลังการหุงต้ม ข้าวที่มีระดับการสลายตัวในด่างระดับ 4 – 5 จะมีลักษณะแข็งปานกลางหลังจากทิ้งไว้ให้เย็นหลังการหุงต้ม ข้าวที่มีระดับการสลายตัวในด่างระดับ 6 – 7 จะมีลักษณะอ่อนนุ่มหลังจากทิ้งไว้ให้เย็นหลังการหุงต้ม

ตาราง 2 ระดับการสลายเมล็ดข้าวในด่างแต่ละเมล็ดตามลักษณะการสลาย

ระดับการสลายเมล็ดข้าวในด่าง	ลักษณะการสลายของเมล็ดข้าวในด่าง
1	เมล็ดข้าวไม่มีการเปลี่ยนแปลง
2	เมล็ดข้าวพองตัว
3	เมล็ดข้าวพองตัว และมีแป้งกระจายออกมาจากบางส่วนของเม็ด
4	เมล็ดข้าวพองตัว และมีแป้งกระจายออกมานอกเมล็ดเป็นบริเวณกว้าง
5	ผิวของเมล็ดข้าวปริออกทางขวางหรือทางยาว และมีแป้งกระจายออกมานอกเมล็ดเป็นบริเวณกว้าง
6	เมล็ดข้าวสลายตัวตลอดทั้งเมล็ด และมีลักษณะเป็นเมือกขาวขุ่น
7	เมล็ดข้าวสลายตัวตลอดทั้งเมล็ด และมีลักษณะเป็นเมือกใส

3.4.3 การงอกของหน่อหลังเก็บเกี่ยว

ประเมินการงอกของหน่อหลังเก็บเกี่ยวโดยใช้ตัวอย่างพันธุ์ที่ปลูกฤดูฝน ทดลองในกระถาง โดยบันทึกจำนวนต้นที่มีการงอกของหน่อหลังเก็บเกี่ยวในแต่ละตัวอย่างพันธุ์ที่ระยะเวลา 2 เดือน, 4 เดือน และ 6 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลอาศัยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล HAT-RAPD

จากการพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวบือชอมีที่ประเมินในขั้นต้นโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและลักษณะที่น่าจะเป็นประโยชน์ ลักษณะของข้าวบือชอมีแต่ละตัวอย่างพันธุ์ที่เห็นว่ามีความแตกต่างกันหรือลักษณะที่พบว่าเหมือนกันนั้นเมื่อนำไปวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลจะพบความแตกต่างหรือไม่ โดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) (Anuntalabhochai et al., 2000) โดยอาศัยเทคนิค PCR ดังนั้นจึงทดลองโดยเก็บตัวอย่างใบของแต่ละตัวอย่างพันธุ์แยกต้นทุกต้นจากตัวอย่างที่ปลูกในฤดูฝนทดลองในกระถาง เก็บตัวอย่างใบของแต่ละตัวอย่างพันธุ์ในซิลิกาเจลเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างแห้งและรักษาสภาพดีเอ็นเอไว้ จากนั้นนำตัวอย่างแห้งที่ได้เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987)

อุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (MJ Research รุ่น PCT-100)
2. ชุดอุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซีส (Eletrophoresis)
3. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงสาร (Centrifuge)
6. เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)
7. เตาไมโครเวฟ
8. หม้อนึ่งความดันไอ
9. UV transilluminator (UVP, USA)
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
11. Adjustable automatic pipetts, yellow tips, blue tips
12. เครื่องบันทึกภาพ
13. Water bath
14. ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
15. Eppendorf tube ขนาด 1.5 มล. , 0.5 มล. และ 0.2 มล.
16. โกร่งบดสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

17. เครื่องแก้วต่างๆ เช่น บีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระบอกตวงปริมาตรต่างๆ แท่งแก้วคนสารเป็นต้น
18. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือยาง, อลูมิเนียมฟอยด์, ช้อนตักสาร, กระดาษชั่งสาร

สารเคมี

1. Stock solution
   - Extraction buffer
   - TE buffer
   - TBE buffer
   - Loading dye
2. Agarose
3. Chloroform
4. Isoamyl alcohol
5. Ethidium bromide 10 mg/ml
6. Absolute ethanol
7. Isopropanol
8. β-mercaptoethanol
9. Rnase A
10. Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)

วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างใบแห้งที่เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส โดยเลือกตัวอย่างใบของต้นที่ไม่มีความแตกต่างในลักษณะทางคุณภาพตัวอย่างพันธุ์ละ 3 ต้น 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%, β-mercaptoethanol แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

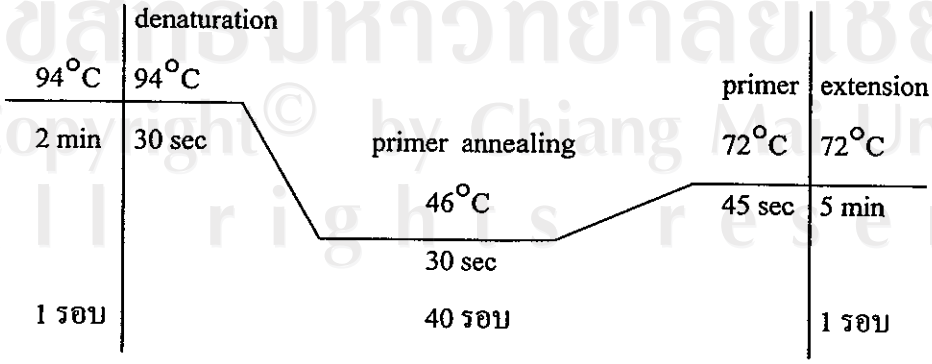
คุณภาพ โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (ปฏิกิริยา PCR)

ปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) และการทำ Agarose Gel Electrophoresis

นำเอาดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มขยายปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยเทคนิค HAT-RAPD ซึ่งดัดแปลงจาก Anuntalabhochai et al. (2000) โดยใช้ไพร์เมอร์ (primer) ของ University of British Columbia (UBC) อย่างสุ่มซึ่งมีชื่อและลำดับเบสดังนี้

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับเบส
	5'----------3'
173	CAG GCG GCG T
208	ACG GCC GAC C
275	CCG GGC AAG C
280	CTG GGA GTG G

เทคนิค PCR ทำโดยการใส่สารผสมปริมาตรประมาณ 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, primer 100 ng/µl 0.8 ไมโครลิตร, 5 unit Taq DNA polymerase 0.125 ไมโครลิตร, DNA template 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่จะนำเข้าเครื่อง PCR เพื่อทำตามเงื่อนไขดังนี้



ภาพ 3 เงื่อนไขของการทำ PCR (HAT-RAPD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 2.0% agarose gel electrophoresis นำเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide 5 µl/TBE buffer 100 ml เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาลอยด์เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ลักษณะเมล็ด ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะที่น่าจะเป็นประโยชน์

ลักษณะต่าง ๆ ของข้าวบือชอมีแต่ละตัวอย่างพันธุ์นำมาคำนวณหา ค่าเฉลี่ย (mean) ค่าขอบเขตข้อมูล (range) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV, %) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) สำหรับการพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลักษณะทางคุณภาพใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon's index (H') โดยคำนวณจากสูตร (Shannon and weaver, 1949 อ้างโดย Power and McSorley, 2000)

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

โดย s = จำนวนชนิดที่พบ

pi = สัดส่วนของชนิดนั้นต่อจำนวนทั้งหมด

ในการพิจารณาหากพบว่าค่า $H' = 0$ หมายถึงไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และ ค่า H' สูงหมายถึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

ข้อมูลในระดับโมเลกุล

นำภาพถ่ายลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอที่น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เดียวกัน โดย 0 หมายถึง ไม่มีแถบ และ 1 หมายถึง ปรากฏแถบ โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างโดยวิธี cluster analysis ด้วยโปรแกรม *POPGENE* (Yeh *et al.*, 1997) ในการคำนวณค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) (Nei, 1972) และนำค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมที่ได้มาสร้าง UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) dendrogram โดยโปรแกรม *MEGA 2* (Kumar *et al.*, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวบือชอมีทั้ง 22 ตัวอย่างพันธุ์ที่มาจากหมู่บ้านเดียวกันและต่างหมู่บ้าน และประเมินคุณสมบัติลักษณะที่น่าจะเป็นประโยชน์ในพันธุ์ข้าวที่รวบรวมได้ทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved