บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษานี้ดำเนินการที่ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ระหว่างเดือนมีนาคม 2547 ถึงเดือน ธันวาคม 2548โดยมีรายละเอียดดังนี้

ประชากรข้าวป่า

ตัวอย่างข้าวป่าสามัญจากพื้นที่ในเขตภาคเหนือตอนบน ภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง (ภาพ 1 และตาราง 2) โดยแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่างลำต้น ใบ และเมล็ดที่สุกแก่ จำนวนจุดละ 10 – 20 ต้น รวมทั้งบันทึกสภาพพื้นที่ที่พบข้าวป่า

การประเมินประชากรข้าวป่า

ปลูกลำต้นประชากรข้าวป่าที่เก็บรวบรวมมาที่แปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่าง เดือน มีนาคม 2547 ถึงเดือนธันวาคม 2548 โดยปลูกประมาณเดือนสิงหาคม 2547 ปลูกประชากรละ 10 – 20 ต้น ปลูกจำนวน 1 ต้นต่อกระถางในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตรใส่ดินนาให้เกือบเต็มถัง รักษาระดับน้ำให้เต็มถังอยู่ตลอดเวลา หลังปลูก 4 อาทิตย์เก็บตัวอย่างใบข้าวป่าแยกต้นจำนวนต้นละ 2-3 ใบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ DNA โดยเก็บตัวอย่างใบข้าวพับใส่ถุงกระดาษเก็บตัวอย่างที่ออกแบบมาเพื่อเก็บตัวอย่างใบข้าวโดยเฉพาะ จากนั้นทำให้ตัวอย่างใบข้าวแห้งโดยนำถุงเก็บตัวอย่างที่บรรจุตัวอย่างใบข้าวใส่ในภาชนะปิดที่มี silica gel เป็นตัวดูดความชื้น จากนั้นบันทึกลักษณะข้าวป่าทุกต้น จากแต่ละประชากร โดยบันทึกลักษณะตามแบบบันทึกที่ปรับปรุงมาจากแบบบันทึกการรวบรวมข้าวป่า (สงกรานต์, 2537) โดยบันทึกลักษณะข้าวป่าในระยะต่างๆ 3 ระยะ ดังนี้

<u>ระยะแตกกอ</u> บันทึกลักษณะทรงกอ สีกาบใบ สีแผ่นใบ สีลิ้นใบ รูปร่างลิ้นใบ สีเขี้ยวใบ จำนวนหน่อต่อต้นจากทุกต้นในทุกประชากร

<u>ระยะออกดอก</u> เมื่อข้าวป่าออกดอกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละประชากร บันทึกวันออกดอก สีข้อ สีปล้อง สียอดดอก การมีหางของเมล็ด สีของหาง สีเกสรตัวเมีย และความยาวเกสรตัวผู้จากทุกต้น ในแต่ละประชากร จากนั้นใช้ถุงกระดาษไขสีขาวคลุมรวงต้นละ 5 รวง เพื่อนำรวงที่คลุมถุงไว้นำมาวัดในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างข้าวป่าสามัญ 12 ประชากร ในเขตภาคเหนือตอนบน ภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางรวม 11จังหวัด

ตาราง 2 สัญลักษณ์ แหล่งที่มา และชนิดของตัวอย่างข้าวป่าสามัญที่ใช้ในการศึกษา

Entry	สัญลักษณ์	แหล่งที่มา	ชนิด
1	CM	พบตามบริเวณสองข้างเลียบคลองส่งน้ำแม่แฝก หมู่บ้านร่มหลวงตำบลแม่แฝก อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่	ข้ามปี
2	LP	พบข้าวป่าตามบริเวณร่องน้ำภายในสวนลำไยในหมู่บ้านป่าขาม ตำบลหนองช้างคืน อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน	ข้ามปี
3	TAK	พบข้าวป่าตามบริเวณข้างทาง (ฝั่งซ้ายมือ) ระหว่างอำเภอวังเจ้า จังหวัดตากกับอำเภอโกสัมพี จังหวัดกำแพงเพชร	ข้ามปี
4	PSL	พบข้าวป่าขึ้นอยู่ทั้งบริเวณรอบๆ ขอบด้านในบึง และแปลงนาร้างที่อยู่รอบๆ บึงทุ่งหง ซึ่งอยู่ในเขตพื้นที่ ตำบลวัดโบสถ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก	ข้ามปี
5	SKT	พบข้าวป่าขึ้นเป็นผืนใหญ่ อยู่ในบริเวณพื้นที่นาร้างมีน้ำขังข้างถนน ซึ่งอยู่ในเขตตำบลทุ่งหลวง อำเภอศีรีมาศ จังหวัดสุโขทัย	ข้ามปี
6	PC	พบข้าวป่าขึ้นเป็นผืนอยู่ในบึง รอบบึง และแปลงนาร้างที่อยู่รอบๆ บึงสีไฟ ซึ่งตั้งอยู่ตำบลท่าหลวง อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร	ข้ามปี
7	PHB	พบข้าวป่าบริเวณสองข้างทางถนนสายเพชรบูรณ์บริเวณหน้าโรงเรียนบ้านดงขวาง ตำบลน้ำขุ่น อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์	ปีเดียว
8	CNT	ประชากรข้าวป่าที่พบเป็นประชากรขนาดใหญ่ ในหนองน้ำ มีน้ำท่วมขัง ตั้งอยู่ในอำเภอมโนรมย์ จ.ชัยนาท คาดว่าขนาดประชากรมีความยาวตามขอบถนนประมาณ 10 กม	ข้ามปี
9	NY 1*	บ้านหน้ากระดาน ตำบลดงละคร อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก พบประชากรข้าวป่าขึ้นอยู่ในบริเวณแปลงนาร้าง หยุดปลูกข้าวประมาณ 3 ปี	Spontanea form
10	NY 2*	พบข้าวป่าขึ้นอยู่ในบริเวณข้างแปลงข้าวของเกษตรกรชื่อ คุณวิเชียร อยู่ที่บ้านหน้ากระดาน ตำบลดงละคร อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก	Spontanea form
11	KAN	พบข้าวป่าขึ้นอยู่ในสภาพธรรมชาติบริเวณหน้าโรงเรียนวัดดอนแสลบ ตำบลห้วยกระเจา อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี	ข้ามปี
12	SN	พบข้าวป่าขึ้นอยู่ในหนองน้ำขนาดใหญ่ในเขตบึงหนองหาร อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร	ข้ามปี

* เก็บตัวอย่างโดยทีมงาน ดร. จรรยา มณีโชติ กรมวิชาการเกษตร

<u>ระยะเก็บเกี่ยว</u> บันทึกลักษณะความสูงที่ระยะเก็บเกี่ยว โดยวัดจากระดับผิวดินจนถึงคอรวง เก็บรวงที่คลุมถุงไว้ต้นละ 3 รวงมาวัดความยาวรวง จำนวนดอกต่อรวง เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด การร่วงของเมล็ด สีเปลือกเมล็ด และสีเยื่อหุ้มเมล็ด จากนั้นสุ่มเมล็ดข้าวป่ามาประชากรละ 30 เมล็ด เพื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วัดความกว้าง ความยาวเมล็ด และทดสอบความสามารถในการพักตัวโดยการทดสอบความงอกจากการใช้กระดาษเพาะความงอกที่ระยะเวลา 30 60 90 120 150 และ180 วันหลังจากเก็บเกี่ยว

หลังเก็บเกี่ยวตัดต้นข้าวให้สูงจากระดับผิวดินประมาณ 5 – 10 เซนติเมตร เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโต และระยะเวลาออกดอกในฤดูกาลต่อไป

ใช้ข้าวปลูก 2 พันธุ์ คือ พันธุ์สุพรรณบุรี1 (SPR1) และขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) นำมาจากเมล็ดพันธุ์หลักและ ข้าวป่าชนิด *O. granulata* เป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ

การวิเคราะห์ DNA

นำตัวอย่างใบข้าวทั้งหมดที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด โดยแยกแต่ละตัวอย่างตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ บดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปสกัด DNAโดยวิธี CTAB ดังนี้

การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบข้าวที่บดแล้วใส่ eppendorf tube จากนั้นใส่ extraction buffer ประกอบไปด้วย deionized water, 4% CTAB, 100mM Tris-HCl (pH 8), 20mM EDTA (pH 8), 1.4 M NaCl และ 0.4% β - mercaptoethanol นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาละลายด้วย TE buffer และทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis 1.2 % เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C

การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยอาศัยเทคนิค microsatellite markers

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ microsatellite primers จำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่ง primer ที่ใช้มีการรายงานว่ามี polymorphism ในข้าวป่าชนิด *O. rufipogon* แต่ละ primers มีลำดับเบสดังนี้ (www.gramene.org)

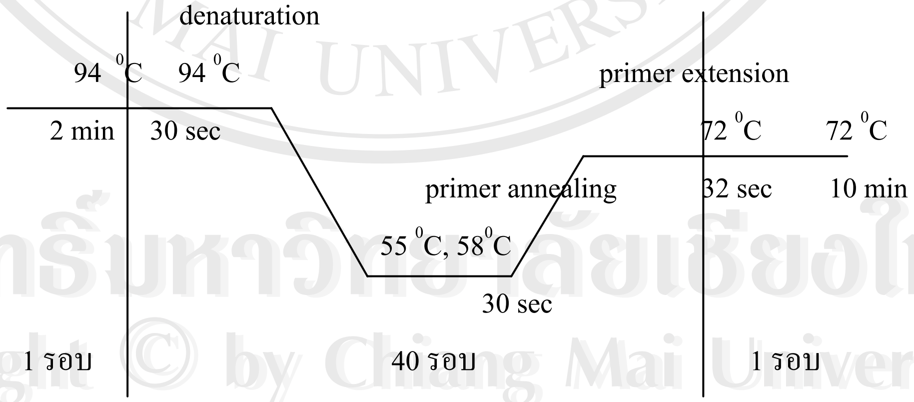
Primer	motif	ลำดับเบส
RM1	(AG)26	F: GCGAAAACACAATGCAAAAA
		R: GCGTTGGTTGGACCTGAC
RM55	(GA) 17	F: CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG
		R: TCCCGGTTATTTTAAGGCG
RM22	(GA) 22	F: GGTTTGGGAGCCCATAATCT
		R: CTGGGCTTCTTTCACTCGTC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

RM164	(GT)16TT(GT)4	F: TCTTGCCCGTCACTGCAGATATCC R: GCAGCCCTAATGCTACAATTCTTC
RM212	(CT) 14	F: AAGGTCAAGGAAACAGGGACTGG R: AGCCACGAATTCCACTTTCAGC
RM211	(TC) 3A(TC) 18	F: CCGATCTCATCAACCAACTG R: CTTCACGAGGATCTCAAAGG
RM253	(GA) 25	F: TCCTTCAAGAGTGCAAAACC R: GCATTGTCATGTCGAAGCC

F; Forward Primer R; Reverse Primer

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



เงื่อนไขการทำ PCR

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 10% polyacrylamide gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ DNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้อง digital เพื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA

การวิเคราะห์ข้อมูล

ลักษณะทางคุณภาพ

วัดความหลากหลายภายในและระหว่างประชากรโดยใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon's Index (*H'*) โดยคำนวณจากสูตร (Shannon and Weaver, 1949 อ้างโดย เทอดศักดิ์ (2547))

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

s	=	จำนวนชนิดที่พบ
pi	=	สัดส่วนของชนิดนั้นต่อจำนวนทั้งหมด

ในการพิจารณาหากพบค่าดัชนีความหลากหลาย $H' = 0$ หมายถึงไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และค่า H' สูงหมายถึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

ลักษณะทางปริมาณ

แต่ละตัวอย่างนำมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าขอบเขตของค่าเฉลี่ย (range) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (cv)

ข้อมูลระดับโมเลกุล

วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการตรวจนับแถบที่ปรากฏในน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เดียวกัน ถ้าหากมีแถบให้เป็น 1 และไม่มีแถบให้เป็น 0 จากนั้นหาระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance)โดยใช้ โปรแกรม POPGEN V 3.2 (population genetic analysis version 3.2) และนำค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมที่ได้มาสร้าง UPGMA (Unweighted Pair-group Method Using arithmetic averages) dendrogram โดยโปรแกรม MEGA 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>ค่าที่ใช้ประเมินความหลากหลายของประชากรข้าวป่าในระดับโมเลกุล</u> (Nei *et al*., 2000)

1. Average Gene Diversity หรือ heterozygosity (h)

$$h = 1 - \sum_{i=1}^{q} X_i^2$$

X_i^2 = ความถี่ของประชากรที่ allele i

q = จำนวนของ allele

ค่า h = 0 แสดงว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมไม่เป็นแบบ heterozygosity ยิ่งค่า h สูงแสดงว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมเป็นแบบ heterozygosity สูง

2. Percentage of polymorphic loci (%P)

$$P = (k/n) \times 100$$

k = จำนวนของ polymorphic loci

n = จำนวน loci ทั้งหมด

ค่า %P = 0 แสดงว่าไม่มี polymorphism และหากค่า %P สูงแสดงว่ามี polymorphism สูง

3. Average gene diversity within population (H_S)

$$H_S = 1 - \sum_{k}^{s} W_k \sum_{i}^{q} X_{ki}^2$$

W_k = 1/s, S = จำนวนประชากรย่อย

X_{ki} = ความถี่ของ allele ที่ i ในประชากรที่ k

เป็นการคำนวณ average heterozygosity ระหว่าง subpopulation มีสัญลักษณ์เป็น H_S หากมีค่าต่ำ แสดงว่ามี heterozygosity ระหว่าง subpopulation ต่ำ

4. Average gene diversity for all population (H_T)

$$H_T = 1 - \sum_{i}^{q} \overline{X}_{ki}^2$$

$\overline{X}_{ki}$ = ค่าเฉลี่ยของความถี่ allele ที่ i ของทุกประชากร

เป็นการคำนวณ average heterozygosity ระหว่าง พื้นที่ที่ศึกษาทั้งหมดมีสัญลักษณ์เป็น H_T หากมีค่าต่ำ แสดงว่ามี heterozygosity ระหว่างพื้นที่ศึกษาทั้งหมดต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. gene differentiation among population (G_{ST})

$$G_{ST} = (H_T - H_S)/ H_T$$

พิจารณาความแตกต่างระหว่างประชากรหากค่า G_{ST} มีค่าเท่ากับ 0 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากร และหากความแตกต่างระหว่างประชากร G_{ST} มีค่าสูงแสดงว่ามีความแตกต่างระหว่างประชากรสูง หรือค่าที่บอกความแปรปรวนที่เกิดจากความแปรปรวนระหว่างประชากร (คิดเป็น %)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved