

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดสอบวิธีการและพารามิเตอร์สำหรับใช้คัดเลือกอ้อยทนแล้ง

พันธุ์อ้อยที่ใช้ในการศึกษาได้แก่พันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งมีลักษณะทนแล้ง (ได้จากการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์โดยภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตร - ศาสตร์ ร่วมกับ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) และโคลนพันธุ์ 93-1-25 ซึ่งไม่ทนแล้ง

ตัดท่อนพันธุ์อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และโคลนพันธุ์ 93-1-25 บริเวณข้อให้มีความยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร โดยให้มีตาเพียง 1 ตาต่อท่อน เพาะในกระบะที่ใส่วัสดุปลูกเป็นทรายผสมขี้เถ้าเกลบในอัตราส่วน 1:1 เมื่อกล้าอ้อยอายุ 1 เดือน จึงคัดเลือกต้นที่มีขนาดเท่ากัน มีใบ 5 ใบ แล้วนำมาล้างวัสดุปลูกออกจากราก

ทดสอบวิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกอ้อยทนแล้งภายใต้ภาวะขาดน้ำจำลอง ที่เรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในโรงเรือนเพาะชำที่มุงหลังคาด้วยพลาสติกใส (โรงเรือน evaporation cooling system) ติดตามข้อมูลอากาศตลอดช่วงการทดลอง โดยติดตั้งอุปกรณ์วัดและบันทึกความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิ (datalogger รุ่น Watchdog 450 บริษัท Spectrum Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา) บรรจุอยู่ในภาชนะกันรังสีแสงแดด ตั้งเวลาให้อ่านค่าทุก ๆ 10 นาที คำนวณค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศ (air vapor pressure deficit, VPD) จากสมการ

$$VPD_{air} = e^{\circ} \times (1-RH)$$

เมื่อ VPD_{air} = ค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศ มีหน่วยเป็น kPa

e° = แรงดันไอน้ำขณะอิ่มตัว ณ อุณหภูมิหนึ่ง (saturation vapor pressure)

RH = ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ ณ ขณะนั้น

สภาวะขาดน้ำแบบที่ 1 นำกล้าอ้อยลงปลูกในกระบะพลาสติกขนาด 40x50x25 เซนติเมตร ใช้ทรายผสมซีเมนต์กลับในอัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุปลูก และให้น้ำวันละ 2 ลิตรเท่ากัน ทุกกระบะ ติดตั้งเครื่องวัดความเครียดของน้ำในดิน (tensiometer บริษัท SoilMoisture Equipment ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อวัดค่าพลังงานก้ำกับก้อนดินของน้ำในวัสดุปลูก (soil matric potential, Ψ_m) โดยฝังในวัสดุปลูกที่ตำแหน่งกึ่งกลางแต่ละกระบะที่ระดับความลึก 20 เซนติเมตรจากผิววัสดุปลูก สร้างสภาพขาดน้ำโดยค่อย ๆ ลดปริมาณน้ำที่ให้กับพืชลงวันละ 20 มิลลิลิตร บันทึกค่าพลังงานก้ำกับก้อนดินโดยเครื่องวัดจาก 0 ถึง -100 กิโลพาสคาล ซึ่งอ่านค่าพลังงานก้ำกับก้อนดินของน้ำในวัสดุปลูกจากหน้าปัดเครื่องได้โดยตรง เก็บข้อมูลเมื่อค่าพลังงานก้ำกับก้อนดินอยู่ที่ระดับ 0, -40 และ -80 กิโลพาสคาล โดยวัดในช่วงเวลาเช้ามีด ตั้งแต่เวลา 1.00 ถึง 3.00 น.

สภาวะขาดน้ำแบบที่ 2 นำกล้าอ้อยลงปลูกเลี้ยงแบบลอยน้ำ โดยตั้งในโพนให้ลอยบน สารละลายในกระบะพลาสติกที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland ดัดแปลงจาก Nagy และ Galiba (1995) ที่มีองค์ประกอบธาตุอาหารลดลง 10 เท่า มีค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหาร (Ψ_{π} solution) เท่ากับ -80 กิโลพาสคาล ปลูกอยู่ในโรงเรือนเพาะชำที่ มุงหลังคาด้วยพลาสติกใส นาน 1 สัปดาห์ จนต้นกล้าตั้งตัวได้ จำลองสภาพขาดน้ำโดยย้ายต้น กล้ามาปลูกเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland ที่มีองค์ประกอบธาตุอาหารลดลง 10 เท่า ร่วมกับการใช้สาร PEG ขนาดมวโมเลกุล 6000 เพิ่มระดับความเข้มข้นของ PEG 6000 ทุก 5 วัน ระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ใช้คือ 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ พลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารในแต่ละช่วงเวลามีค่าเท่ากับ -200, -800, -1,600 และ -3,800 กิโลพาสคาล ตามลำดับ โดยให้อ้อยอยู่ในสารละลายธาตุอาหารที่ใส่ PEG ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน มีการเติมน้ำเพื่อปรับให้ปริมาตรสารละลายเท่าเดิมทุกวัน หลังจากนั้นจะเพิ่มระดับ PEG เป็น 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ในทุก ๆ 5 วัน เพื่อสร้างสภาพให้อ้อยเผชิญกับการลดลงของ ค่าพลังงานศักย์ของน้ำเป็นลำดับขั้น ปรับ pH ของสารละลายธาตุอาหารทุกวันให้อยู่ที่ 5.8 เพื่อ ป้องกันผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายธาตุอาหารที่ขอย่างรวดเร็ว และ ให้ออกซิเจนแก่รากในทุกกระบะโดยใช้ปั๊มเติมอากาศ เพื่อป้องกันรากพืชขาดออกซิเจน เก็บข้อมูล ต้นที่ปลูกในสารละลายสูตรควบคุม (ไม่เติมสาร PEG) เปรียบเทียบกับต้นที่ปลูกในสารละลายธาตุ อาหารที่เติม PEG ในแต่ละระดับความเข้มข้นเป็นเวลา 5 วัน โดยวัดในช่วงเวลาเช้ามีด ตั้งแต่เวลา 1.00 ถึง 3.00 น.

ลักษณะทางสรีรวิทยาที่เลือกมาศึกษาคือ พลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพืช (total leaf water potential ; Ψ_t) ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำ (osmotic potential, $\Psi\pi$) ค่าพลังงานความดันของน้ำ (turgor potential, Ψ_p)

การวัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ_t)

เลือกใบอ่อนที่เจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งเป็นใบตำแหน่งที่ 3 นับจากยอดลงมา จากแต่ละสายพันธุ์เพื่อวัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ โดยใช้เครื่องวัดความดัน (pressure chamber บริษัท SoilMoisture Equipment ประเทศสหรัฐอเมริกา) ซึ่งอาศัยหลักการวัดของ Boyer (1995) คือวัดพลังงานความดันภายในท่อน้ำของพืช โดยใช้แผ่นพลาสติกใส (wrap) ห่อใบที่เลือกไว้เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ แล้วตัดใบมาเข้าเครื่องวัดที่ต่อกับแหล่งความดันคือก๊าซไนโตรเจน อ่านค่าความดันเมื่อเริ่มเห็นฟิล์มของน้ำปรากฏที่ปลายใบ บันทึกค่าความดันที่ได้ซึ่งจะอยู่ในรูปค่าติดลบเป็นค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ มีหน่วยเป็นกิโลพาสคาล (kPa) จากนั้นถอดใบออกจากเครื่องวัด นำใบบรรจุลงในหลอดพลาสติกที่สะอาด ปิดจุกที่ปลายทั้งสองด้านด้วยจุกยาง แขนไนโตรเจนเหลว จากนั้นย้ายมาเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อบรรเทาการวัดค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในห้องปฏิบัติการต่อไป

การวัดค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ($\Psi\pi$)

วัดค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบด้วยเครื่องออสโมมิเตอร์ (osmometer รุ่น Vapro 5520 บริษัท Wescor ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้หลักการความแตกต่างของอุณหภูมิเริ่มต้นของตัวอย่างกับจุดน้ำค้างของสารละลาย (dew point hygrometry) จากสารละลายที่คั่นได้จากตัวอย่างใบ (Boyer, 1995) เริ่มจากนำตัวอย่างใบอ่อนที่บรรจุในหลอดพลาสติกและเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ออกมาวางที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ น้ำแข็งละลาย ระหว่างนั้นทำเส้นตรวจเทียบ (calibration curve) โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์มาตรฐาน ความเข้มข้น 100, 290 และ $1000 \text{ mmol kg}^{-1}$ หลังจากนั้นนำหลอดตัวอย่างมาคั่นน้ำให้ทั่วขึ้นใบโดยใช้เครื่องบีบรัดหลอดตัวอย่าง เพื่อให้สารละลายในเซลล์ผสมกันทั่วถึง ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองที่วางบนภาชนะหัววัดของเครื่อง ปิดภาชนะหัววัด แล้วรอให้เกิดสมดุลของไอ น้ำ โดยเครื่องจะกำหนดเวลาโดยอัตโนมัติ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 75 วินาที เครื่องจะอ่านค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายในภาชนะใส่สารตัวอย่าง บันทึกค่าความเข้มข้น หน่วยเป็น mmol kg^{-1}

นำค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายมาคำนวณเป็นค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ตามสมการของ van't Hoff คือ $\Psi\pi = -RTCi$ สำหรับการวัดด้วยเครื่อง osmometer นี้ อุณหภูมิของสารละลายตัวอย่างในเครื่องมีค่าเท่ากับ 25 องศาเซลเซียสเสมอ ดังนั้นค่าพลังงานความเข้มข้นจึงเท่ากับ $\Psi\pi = -2.5Ci$

การวัดค่าพลังงานความดันของน้ำในใบ (Ψ_p)

เมื่อได้ค่าพลังงานศักย์รวมและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำแล้ว คำนวณค่าพลังงานความดันน้ำในใบอ้อย โดยใช้สมการ $\Psi_t = \Psi\pi + \Psi_p$

วิเคราะห์ mean-seperation โดยวิธี t-test เพื่อหาระดับการขาดน้ำและพารามิเตอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างอ้อยพันธุ์ทนแล้งและพันธุ์ไม่ทนแล้งได้ ซึ่งพารามิเตอร์และวิธีการนี้จะถูกคัดเลือกมาใช้ในการตรวจสอบประชากร F_2 ต่อไป

การหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีนควบคุมลักษณะทนแล้ง

1. การสร้างประชากรชั่วที่ 2 (F_2)

พันธุ์อ้อยที่ใช้ในการศึกษาคือ พันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมจากการผสมเปิด โดยมีโคลนพันธุ์ 89-1-20 เป็นพันธุ์แม่ มีลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญคือทนแล้ง การสร้างประชากรชั่วที่ 2 ทำได้โดยนำอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งถือว่าเป็นลูกผสมชั่วแรก (F_1) มาผสมตัวเอง เมื่อได้เมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองแล้ว จึงเพาะเมล็ดแยกเป็นประชากร F_2 แต่ละสายพันธุ์ เมื่อต้นอ้อยอายุ 6 เดือน นำมาปลูกทดสอบตามวิธีการที่ใช้ในการคัดเลือก วัดค่าพารามิเตอร์ที่ได้ตามผลการทดลองในส่วนแรก และวัดความสามารถในการฟื้นตัวหลังได้รับน้ำ

วางแผนการทดลองแบบ augmented randomized complete block design เพื่อให้ได้ข้อมูลของประชากร F_2 ที่มีการปรับข้อมูลอันเนื่องมาจากความแตกต่างของสภาพแวดล้อมที่ปลูกแล้ว โดยใช้ข้อมูลความแตกต่างโดยรวมของพันธุ์มาตรฐาน (check variety) ได้แก่ พันธุ์กำแพงแสน 94-13 พันธุ์ K84-200 และโคลนพันธุ์ 93-1-25 ในแต่ละบล็อกในการปรับข้อมูลของประชากร F_2 ที่ปลูกในบล็อกนั้น ๆ

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมดีเอ็นเอจากใบอ่อนของอ้อยอายุประมาณ 5 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ด โดยตัดใบอ่อนจากแต่ละต้น F_2 มาบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ใช้ข้องัดตัวอย่างพืชใส่ในหลอดไมโครเซ็นติพีพิจขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติมสารละลาย extraction buffer (CTAB 2%, $NaCl_2$ 1.4 M, PVP 2%, EDTA pH 8.0 20 mM, Tris HCl pH 8.0 100 mM และ 2-mercaptoethanol 2%) ซึ่งอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบดในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นแช่ในน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ใช้ปิเปตดูดเฉพาะส่วนใสที่อยู่ด้านบนย้ายมาใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันเบา ๆ โดยกลับหลอดไปมา นาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดเฉพาะสารละลายส่วนบนไปใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ และปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากย้ายสารละลายส่วนบนไปใส่หลอดใหม่แล้วเติม absolute ethanol ที่แช่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอลที่แช่เย็น ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เทสารละลายในหลอดทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมอีกครั้ง เทสารละลายทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยสารละลาย TE บัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 20-50 ไมโครลิตร

ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ร่วมกับ agarose gel 1.0 % ผ่านสนามไฟฟ้า 100 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5xTBE เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye (bromophenol blue 0.25%, glycerol 30%) 9 ไมโครลิตร จากนั้นนำ agarose gel มาข้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที แล้วจึงนำมาส่องดูภายใต้แสงยูวี ประมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่รู้ความเข้มข้นแน่นอนแล้ว

3. การตรวจหาแถบดีเอ็นเอโดยการวิเคราะห์ bulked segregant

3.1 การสร้างกลุ่มดีเอ็นเอสำหรับ bulked segregant analysis

เตรียมดีเอ็นเอจาก F_2 แต่ละต้น ให้มีความเข้มข้นตั้งต้นตัวอย่างละ 1 ไมโครกรัม นำมารวมเป็นกลุ่มดีเอ็นเอของประชากร F_2 กลุ่มละ 7 ต้น ตามค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำ คือกลุ่มดีเอ็นเอของประชากร F_2 ที่รักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำไว้ได้สูง และกลุ่มดีเอ็นเอของประชากร F_2 ที่แสดงค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำในระดับต่ำ

3.2 การตรวจหาแถบดีเอ็นเอโดยวิธี AFLP

3.2.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เตรียมแต่ละกลุ่มดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นต้นแบบ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน ได้แก่ *EcoRI* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, บริษัท Fermentas) และ *MseI* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, บริษัท Fermentas) 1 ไมโครลิตร ใส่ร่วมกับ บัฟเฟอร์ A (บริษัท Roche) 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 20 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง

3.2.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมาต่อดังด้วย *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ที่ปลายทั้งสองด้าน โดยผสม 10x ligation buffer (บริษัท Fermentas) 1 ไมโครลิตร *EcoRI* adapter (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ *MseI* adapter (50 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ATP (10 มิลลิโมลลาร์) 1 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (บริษัท Fermentas) 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุทธิด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิดแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

ลำดับเบสของ adapter ได้แก่

<i>EcoRI</i> adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>MseI</i> adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'

3.2.3 การทำ pre-selective amplification

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อกับ adapter แล้วมาเจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น และนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว 2 ไมโครลิตร ใส่ร่วมกับ *EcoRI* primer (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และ *MseI* primer (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) ที่เพิ่มเบสคัดเลือกร่วม 1 เบสทางด้านปลาย 3' ชนิดละ 1 ไมโครลิตร 10x PCR บัฟเฟอร์ (บริษัท Fermentas) 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (บริษัท Fermentas, 25 มิลลิโมลลาร์) 1.2 ไมโครลิตร dNTPs (บริษัท Fermentas, 1 มิลลิโมลลาร์) 4 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase (บริษัท Fermentas, 5 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุทธิให้ได้ 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำเข้าเครื่อง PCR (GeneAmp PCR System 9700) โดยตั้งโปรแกรมให้ pre-denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 25 รอบ ต่อด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ผลผลิตที่ได้จากการทำ pre-selective amplification จะใช้เป็นต้นแบบในการทำ selective amplification ในขั้นต่อไป

3.2.4 การทำ selective amplification

นำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากขั้นตอน pre-selective amplification มาเจือจาง 20 เท่า และใช้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา เดิม 10x PCR บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลลาร์) 0.6 ไมโครลิตร ร่วมกับ *EcoRI* primer (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และ *MseI* primer (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) ที่เพิ่มเบสคัดเลือกร่วม 3 เบสทางด้านปลาย 3' ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร dNTP (1 มิลลิโมลลาร์) 2 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุทธิให้ได้ 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำ

กลับ นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมให้ pre-denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตั้งอุณหภูมิให้ลดลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จนถึง 56 องศาเซลเซียส แล้วทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสำหรับ annealing ที่ 56 องศาเซลเซียสต่อไปอีก 25 รอบ ต่อด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปฏิกิริยาก็จะเสร็จสมบูรณ์ จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอต่อไป

ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ มีดังนี้

	Core bases	Enzyme code	Selective base
EcoRI primer	5' – GACTGCGTACC	AATTC	NNN – 3'
MseI primer	5' – GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN – 3'

3.2.5 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วมาใส่สีย้อม sequencing dye (10mM EDTA pH 8.0, 98% formamide, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol) ตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที เพื่อให้อุณหภูมิเย็นลงอย่างรวดเร็ว นำมาตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน denaturing polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4.5 % ในบัฟเฟอร์ 1xTBE (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM boric acid, 2 mM EDTA) ทำ pre-run 30 นาที ใช้กำลังไฟฟ้า 80 วัตต์ นำดีเอ็นเอตัวอย่างมาหยอดลงในช่องเจล แล้วใช้กำลังไฟฟ้า 40 วัตต์ นาน 2 ชั่วโมง

ย้อมเจลด้วยวิธี silver staining โดยนำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาวางบนเครื่องเขย่า แช่ในสารละลาย acetic acid ความเข้มข้น 10 % นาน 30 นาที เพื่อล้างยูเรียที่เป็นส่วนผสมใน polyacrylamide gel ออก พร้อมกับเขย่าเบาเพื่อให้เกิดการหมุนวนของสารตลอดเวลา จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที นำมาย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (1% silver nitrate, 0.56% formaldehyde) นาน 30 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา นำแผ่นกระจกออกมา

ล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว เพื่อล้าง silver stain ส่วนเกินออก ย้ายเจลมาเขย่าในสารละลาย develop (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulfate, 0.56% formaldehyde) ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นไว้ เมื่อเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย acetic acid ความเข้มข้น 10 % ล้างกระจกด้วยน้ำกลั่น 15 นาที นำกระจกไปผึ่งให้แห้ง แล้วบันทึกผลต่อไป

3.2.6 การตรวจสอบเครื่องหมาย AFLP

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของแต่ละคู่ไพรเมอร์ โดยให้คะแนน 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่มในตำแหน่งเดียวกัน คือเกิดแถบดีเอ็นเอในกลุ่มที่รักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำไนโบ และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำไว้ได้สูง และไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในกลุ่มที่ให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำไนโบ และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำในระดับต่ำ

4. การตรวจหาแถบดีเอ็นเอโดยการวิเคราะห์ selective genotyping

ตรวจสอบผลการให้คะแนนจากการวิเคราะห์ bulked segregant โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่ม มาตรวจสอบดีเอ็นเอจากแต่ละต้นของประชากร F_2 ที่นำมารวมเป็น bulked ด้วยการวิเคราะห์ AFLP ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว

คัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มประชากรตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม และยืนยันผลโดยการนำไปตรวจสอบในประชากร F_2 แต่ละสายพันธุ์ต่อไป

5. การทดสอบเครื่องหมาย AFLP ในประชากร F_2

5.1 วิเคราะห์ single marker analysis ระหว่างข้อมูลของลักษณะความสามารถในการรักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำไนโบ และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำไว้ได้สูง กับเครื่องหมาย AFLP ทั้งหมดที่ใช้ตรวจสอบประชากร F_2 เครื่องหมาย AFLP ใดที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเครื่องหมาย AFLP นั้นมีความเชื่อมโยงกับยีน หรือ QTL ที่ควบคุมความสามารถในการรักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำไนโบ และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำไว้ได้สูง

5.2 วิเคราะห์ multiple-loci regression ในกลุ่มของเครื่องหมาย AFLP ที่แสดงความแตกต่างทางสถิติจากการวิเคราะห์ single marker analysis เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของเครื่องหมาย AFLP ต่อการแสดงออกของลักษณะที่ศึกษา

สถานที่ทำการทดลอง

เรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

เรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

เรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่เดือนเมษายน 2545 สิ้นสุดการทดลองเดือนสิงหาคม 2549