บทที่ 3
วิธีการวิจัย

สายพันธุ์บวบเหลี่ยมสำหรับทดสอบ

เมล็ดพันธุ์บวบเหลี่ยมจาก 4 แหล่งพันธุกรรม จำนวน 20 สายพันธุ์ จากบริษัท East West Seed Co., Ltd. ได้แก่

1. แหล่งที่ 1 สายพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากประเทศบังคลาเทศ ได้แก่ RGEW001 RGEW002 RGEW003 RGEW004 RGEW005
2. แหล่งที่ 2 สายพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากประเทศอินเดียได้แก่ RGEW006 RGEW007 RGEW008 RGEW009 RGEW010
3. แหล่งที่ 3 สายพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากประเทศไทยได้แก่ RGEW011 RGEW012 RGEW013 RGEW014 RGEW015
4. แหล่งที่ 4 สายพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากจีนได้แก่ RGEW016 RGEW017 RGEW018 RGEW019 RGEW020

เชื้อสาเหตุโรคที่ใช้ในการศึกษาระดับความรุนแรง

เชื้อรา *Phoma* spp. (asexual stage) สาเหตุโรคใบไหม้เถาแตกยางไหลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในแปลงบวบเหลี่ยม อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการโรคพืชได้แก่ ห้องควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นและแสง หม้อนึ่งความดัน ตู้แยกเชื้อ เฮมาไซโตมิเตอร์ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องชั่งละเอียด มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้วบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ หม้อนึ่งความดันไอน้ำสูง ตู้เขี่ยเชื้อ แท่งแก้ว บีกเกอร์ เป็นต้น

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) ได้แก่ มันฝรั่ง วุ้นผง น้ำตาล Dextrose น้ำกลั่นแอลกอฮอล์ น้ำกลั่น เป็นต้น

เครื่องมืออุปกรณ์สำหรับการเตรียมต้นกล้าและแปลงปลูกได้แก่ ถาดเพาะเมล็ด ไม้ค้าง ตาข่าย พลาสติกคลุมแปลง เครื่องพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ เป็นต้น

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ได้แก่ เครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีส เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส เครื่องส่องแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไว้โอเลต เครื่องหมุนเหวี่ยง เครื่องชั่งละเอียด (Balance) 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง ที่วางหลอดตัวอย่าง (Rack) กล้องดิจิตอล กระบอกตวง โกร่ง ไมโครปิเปตต์ บีกเกอร์ ปากคีป ทิป เป็นต้น

สารเคมีที่ใช่ในการสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาได้แก่ 2x CTAB, chloroform isoamyl alcohol, isopropanal, TE-dye, TE buffer, $MgCl_2$, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA (pH 8), dNTPs, 1 M Tris-HCI (pH 8.0), 75 เปอร์เซนต์ ethanol และน้ำกลั่น เป็นต้น

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกหาพันธุ์ต้านทานในระยะต้นกล้าภายใต้สภาพโรงเรือน

1. จัดการทดลองแบบปัจจัยเดียวในแผนการทดลองสุ่มอย่างสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) เชื้อราสาเหตุสำหรับทดสอบ 1 ตัวอย่างกับสายพันธุ์บวบเหลี่ยม จำนวน 20 สายพันธุ์ 3 ซ้ำโดยใช้จำนวน 24 ต้นต่อสายพันธุ์

2. การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ ทำการแยกเชื้อราบริสุทธิ์ *Phoma* spp. (asexual stage) จากบวบเหลี่ยมในแปลงปลูก โดยการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชแช่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1 เปอร์เซนต์ นาน 3-4 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง แล้วใช้กระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วซับน้ำให้แห้งจากนั้นจึงวางเนื้อเยื่อตัวอย่างพืช ในอาหารเลี้ยงเชื้อราสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส และทำการขยายเชื้อบริสุทธิ์สำหรับทดสอบโดยการใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อให้ท่วมเส้นใยแล้วใช้พู่กันปัดสปอร์ลงในบีกเกอร์จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางจำนวน 2 ชั้น แล้วทำการตรวจวัดปริมาณสปอร์โดยใช้ Heamacytometer เพื่อทำการปรับความเข้มข้น ทำการเตรียมเชื้อราทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3. การปลูกเชื้อสาเหตุ ทำในระยะต้นกล้าหลังมีใบจริง 1-2 ใบ หรือประมาณ 7- 14 วัน หลังเพาะเมล็ดในถาดพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 2.5 – 3 เซนติเมตร แล้วจึงย้ายปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร ภายใต้สภาพโรงเรือน อุณหภูมิ ประมาณ 24 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความชื้น ประมาณ 85 เปอร์เซนต์ และทำการประเมินโรค

เพื่อดูการเข้าทำลายของเชื้อ หลังปลูกเชื้อทุก 7 เป็นเวลา 28 วัน ทำการประเมินระดับความต้านทาน โดยจัดระดับตามการแสดงออกของโรคที่พบบริเวณใบ ก้านใบ และลำต้น

4. การบันทึกข้อมูล ประเมินระดับการเกิดโรคโดยประยุกต์จากวิธีการของ Wehner and Shetty (2000) ให้คะแนนระดับอาการของโรค 9 ระดับ ดังนี้

0 = ไม่แสดงอาการ

1 = อาการใบเหลืองทั้งหมด

2 = มีแผลเฉพาะที่ใบน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์

3 = มีแผลเฉพาะที่ใบระหว่าง 21-45 เปอร์เซ็นต์

4 = มีแผลเฉพาะที่ใบมากกว่า 45 เปอร์เซ็นต์

5 = มีแผลใบไหม้ แต่ไม่แสดงอาการที่ลำต้น

6 = มีแผลใบไหม้น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และมีแผลที่ก้านใบและลำต้น น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร

7 = อาการใบไหม้ที่ใบระหว่าง 21-45 เปอร์เซ็นต์และมีแผลที่ก้านใบและ ลำต้น 3-5 มิลลิเมตร

8 = อาการใบไหม้ที่ใบมากกว่า 45 และมีแผลที่ก้านใบและลำ ต้นมากกว่า 5 มิลลิเมตร

9 = ต้นตาย

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นที่แสดงอาการ} \times 100}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}}$$

5. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม R2.13.0 (R-Language and environment for statistical computing and graphics) (ชูศักดิ์, 2552)

การทดลองที่ 2 การคัดเลือกหาพันธุ์ต้านทานในสภาพแปลง

1. จัดการทดลองแบบปัจจัยเดียวในแผนการทดลองสุ่มในบลอกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design ; RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ (replications) ประกอบด้วย 20 สิ่งทดลอง (Treatments) รวมทั้งหมด 60 แปลงย่อย โดยใช้ตัวอย่าง จำนวน 10 ต้นต่อสิ่งทดลอง

2. การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ ทำการแยกเชื้อราบริสุทธิ์ *Phoma* spp. (asexual stage) จากบวบเหลี่ยมในแปลงปลูก โดยการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชแช่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 3-4 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง แล้วใช้กระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วซับน้ำให้แห้งจากนั้นจึงวางเนื้อเยื่อตัวอย่างพืช ในอาหารเลี้ยงเชื้อราสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส และทำการขยายเชื้อบริสุทธิ์สำหรับทดสอบ โดยการใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อให้ท่วมเส้นใยแล้วใช้พู่กันปัดสปอร์ลงในบีกเกอร์จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางจำนวน 2 ชั้น แล้วทำการตรวจวัดปริมาณสปอร์โดยใช้ Heamacytometer เพื่อทำการปรับความเข้มข้น ทำการเตรียมเชื้อราทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3. การปลูกเชื้อสาเหตุ โดยทำการปลูกบวบเหลี่ยมสายพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานโดยการพ่นเชื้อในระยะต้นกล้ามีใบจริง 2-3 ใบ เพื่อสร้างจำนวนประชากรโรคในสภาพแปลงล่วงหน้าก่อน 30 วัน แล้วจึงทำการปลูกพืชทดสอบ 20 สายพันธุ์ จากนั้นจึงทำการปลูกเชื้อในพันธุ์ทดสอบหลังต้นกล้ามีใบจริง 1-2 ใบ ทำการเก็บข้อมูลอาการของโรคหลังปลูกเชื้อในพันธุ์ทดสอบทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน ทำการประเมินระดับความต้านทานของโรคที่พบบริเวณใบ ก้านใบ ลำต้นและการเจริญเติบโตทั่วไปของต้นและผล ในสภาพแปลง

4. การบันทึกข้อมูล วิธีการประเมินระดับการการเกิดโรค โดยการให้คะแนนระดับอาการของโรค 9 ระดับ ตามวิธีการ Wehner and Shetty (2000) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

5. วิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วย โปรแกรม R2.13.0 (R-Language and environment for statistical computing and graphics)

การทดลองที่ 3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบวบเหลี่ยม

สายพันธุ์บวบเหลี่ยม

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมบวบเหลี่ยมระดับดีเอ็นเอโดยนำเมล็ดบวบเหลี่ยม 21 สายพันธุ์ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากประเทศบังคลาเทศ ได้แก่ RGEW001 RGEW002 RGEW003 RGEW004 RGEW005 กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากประเทศอินเดียได้แก่ RGEW006 RGEW007 RGEW008 RGEW009 RGEW010 กลุ่มที่ 3 สายพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากประเทศไทยได้แก่ RGEW011 RGEW012 RGEW013 RGEW014 RGEW015 กลุ่มที่ 4 สายพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากจีนได้แก่ RGEW016 RGEW017 RGEW018 RGEW019 RGEW020 และสายพันธุ์บวบหอม RGEW021 สำหรับเปรียบเทียบซึ่งอยู่นอกกลุ่มกับพันธุกรรมบวบเหลี่ยม

การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอพืช

สกัดดีเอ็นเอบวบเหลี่ยม 20 สายพันธุ์และบวบหอม 1 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1987) เก็บตัวอย่างจากใบอ่อนของต้นกล้าอายุประมาณ 14 วัน ที่มีใบจริง 2-3 ใบ ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1 กรัม บดใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรโดยใช้สารละลาย 2xCTAB ปริมตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วเติมสารละลาย chloroform-isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ปิดฝาให้แน่นเขย่าแรง ๆ 1-2 นาที ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 15 นาที ดูดสารละลายที่ใส(ด้านบน)ใส่หลอดทดลองใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม isopropanal ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในส่วนใส่ เขย่าเบา ๆ ประมาณ 30 วินาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละสารละลายทิ้ง (จะเห็นดีเอ็นเอจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด) ตากดีเอ็นเอไว้ให้แห้งโดยการคว่ำหลอดทดลองไว้กับตะแกรง

เมื่อดีเอ็นเอแห้งแล้วทำการเติม 70% EtOH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าหลอดทดลองเบา ๆ ใช้นิ้วดีดเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนเข้ากันได้ดีกับสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งประมาณ 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เติม TE buffer ปริมาตร 100

ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องรอจนดีเอ็นเอละลายหมด(อาจใช้การดีดหลอดเบา ๆ) เก็บรักษาดีเอ็นเอตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง spectrophotometer โดยอาศัยหลักการที่เบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร และสารละลายดีเอ็นเอที่เข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (A_{260}หรือ OD_{260}) ซึ่งสามารถคำนวณหาความข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอได้จากสูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) = AD_{260} x 50 x dilution factor

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดดีเอ็นเอทำได้โดยเทียบอัตราส่วนของค่า (A_{260} /A_{260}) ดังนี้

(A_{260} /A_{260}) > 2.0 หมายถึง สารสกัดดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ

1.8 - 2.0 หมายถึง สารสกัดดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง

1.6 - 1.8 หมายถึง สารสกัดดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์

(A_{260} /A_{260}) < 1.6 หมายถึง สารสกัดดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล

(แสงทอง, 2552)

และทำการตรวจสอบและวิเคราะห์แถบ DNA ด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)โดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้ในสารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวล์ เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างสีย้อมด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาณของดีเอ็นเอจากความเข้มของแสงของแถบดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล (agarose gel) แล้วถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอลภายใต้แสงอุตราไวโอเล็ต

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์บวบเหลี่ยม

การหาความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอของสายพันธุ์บวบเหลี่ยม 20 สายพันธุ์และบวบหอม 1 สายพันธุ์ ทำการประเมินลักษณะเครื่องหมายทางพันธุกรรมโดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆให้คะแนน (1) ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันให้คะแนน (0) หากไม่มีผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ตัวเลข (9) จากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method using Arithmetic method, UPGMA)โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc.(Numerical Taxnomy and Multivariate Analysis System) นำข้อมูลเครื่องหมายที่พบแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับลักษณะความต้านทานโรคโดยวิเคราะห์วิเคราะห์ความแปรปรวน Simple linear regression และ Multiple locus regression ด้วยโปรแกรม R2.13.0 (R-Language and environment for statistical computing and graphics)

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินงาน

เวลา	เริ่มดำเนินการ	เดือนสิงหาคม 2553
	สิ้นสุด	เดือนกุมภาพันธ์ 2556
สถานที่	แปลงทดลองโรงเรือนและห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล บริษัท ฮอทิเจนเนติคส์ รีเสิร์ท (เอส.เอ.เอเซีย จำกัด) เลขที่ 7 หมู่ 9 ตำบลแม่แฝกใหม่ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่	