# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการ

## 1. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของงา จำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ PCR based marker ประกอบด้วย 2 งานทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในต้นฤดูฝนและปลายฤดูฝน

การทดลองที่ 2 การจำแนกพันธุ์ของงาโดยใช้ PCR based markers

### 1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในต้นฤดูฝนและปลายฤดูฝน

1) พันธุ์และสายพันธุ์งาที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน 34 พันธุ์/สายพันธุ์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการปรับปรุงพันธุ์งา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น และศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร

2) ปลูกงาพันธุ์ละ 5 แถว ในแปลงทดลองขนาดแปลงกว้าง 2.5 เมตร ยาว 5 เมตร ระยะห่างระหว่างต้นปลูก 10 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างแถว 50 เซนติเมตร เตรียมแปลงโดยใส่ปูนขาวอัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ ก่อนปลูกคลุกสารเคมีแบนเลทป้องกันเชื้อรา ปลูก 5 เมล็ดต่อหลุม หลังจากเมล็ดงอกทำการถอนแยกให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ที่อายุ 15 วันและ 30 วันหลังงอก กำจัดวัชพืชและฉีดพ่นสารเคมีป้องกันโรคและแมลงตามความเหมาะสม

3) บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการสุ่มตัวอย่าง 5 ต้น ต่อหนึ่งพันธุ์/สายพันธุ์โดยดูลักษณะที่ส่วนใหญ่ของพันธุ์/สายพันธุ์นั้น โดยการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 22 ลักษณะ (ภาคผนวก ข ตารางผนวกที่ 1)

ตารางที่ 1 งาจำนวน 34 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

| ลำดับ | พันธุ์/สายพันธุ์ | แหล่งพันธุ์ | ประวัติ (pedigree) |
|---|---|---|---|
| 1 | พันธุ์ป่า (wild type) | อินเดีย | - |
| 2 | งาแดงพื้นเมือง (local red) | งาแดงพื้นเมือง | - |
| 3 | BL1 | พม่า | - |
| 4 | BL5 | พม่า | - |
| 5 | WL9 | งาขาวพื้นเมือง | - |
| 6 | MKSI84001 | FAO/1 | - |
| 7 | IS-1-21 | อิสราเอล | - |
| 8 | S-25 | อินเดีย | - |
| 9 | GMUB1/2 | ศวจ.อุบราชธานี | - |
| 10 | GMUB3/2 | ศวจ.อุบราชธานี | - |
| 11 | GMUB4/2 | ศวจ.อุบราชธานี | - |
| 12 | GMUB5/2 | ศวจ.อุบราชธานี | - |
| 13 | GMUB7/2 | ศวจ.อุบราชธานี | - |
| 14 | GMUB8/2 | ศวจ.อุบราชธานี | - |
| 15 | มข.1 (KKU1) | จีน | - |
| 16 | มข.2 (KKU2) | จีน | - |
| 17 | มข.3 (KKU3) | พม่า | - |
| 18 | NS4 | ศวจ.อุบราชธานี | MK60xสายพันธุ์จากอเมริกา |
| 19 | NS6 | ศวจ.อุบราชธานี | MK60xสายพันธุ์จากอเมริกา |
| 20 | NS14 | ศวจ.อุบราชธานี | MK60xสายพันธุ์จากอเมริกา |
| 21 | NS15 | ศวจ.อุบราชธานี | MK60xสายพันธุ์จากอเมริกา |

/1 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จาก FAO ไม่ทราบแหล่งที่มาของพันธุ์

/2 GMUB ทุกสายพันธุ์เป็นงาพื้นเมืองที่ได้รับการฉายรังสีแล้วจึงนำมาคัดเลือกพันธุ์

ตารางที่ 1 งาจำนวน 34 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา(ต่อ)

| ลำดับ | พันธุ์/สายพันธุ์ | แหล่งพันธุ์ | ประวัติ |
|---|---|---|---|
| 22 | LH220 | ศวจ.อุบราชธานี | MK60x Terrass 77 |
| 23 | LH214 | ศวจ.อุบราชธานี | MK60xSesamum 55 |
| 24 | บุรีรัมย์ (Buriram) | พื้นเมืองบุรีรัมย์ | - |
| 25 | ร้อยเอ็ด (Roi-et) | ญี่ปุ่น | - |
| 26 | อุบลราชธานี1(Ubon1) | พม่า | - |
| 27 | เลย (Loei) | พื้นเมืองเลย | - |
| 28 | นครสวรรค์ (Nakornsawan) | พื้นเมืองนครสวรรค์ | - |
| 29 | MR36 | พม่า | - |
| 20 | MR4 | พม่า | - |
| 31 | MR13 | พม่า | - |
| 32 | มก.18 (KU18) | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | Col/34xMKSI81111 |
| 33 | มหาสารคาม60 ( MK60) | อินเดีย | - |
| 34 | MKSI83042 | FAO/2 | - |

FAO/2 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จาก FAO ไม่ทราบแหล่งที่มาของพันธุ์

**1.2 การจำแนกพันธุ์ของงาโดยใช้ PCR based markers**

**1.2.1 การเตรียม DNA**

**ก) การเตรียมพืชทดลอง**

ทำการปลูกงา เมื่องาอายุได้ 7 วัน เก็บใบอ่อนโดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากยอดงาต้นละสองใบ พันธุ์ละ 3 ต้น ใส่ถุงพลาสติกใส ระหว่างเคลื่อนย้ายตัวอย่างมาที่ห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างเก็บในน้ำแข็ง เพื่อรักษาความสดของตัวอย่าง

**ข) การสกัด DNA**

นำใบอ่อนงาที่เก็บในน้ำแข็งมาสกัด DNA โดยนำตัวอย่างละ 2 กรัม มาสกัดโดยวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ตามขั้นตอนตอนไปนี้

1) นำตัวอย่างใบที่ได้มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว เพื่อให้เนื้อเยื่อใบแตกเป็นชิ้นละเอียด บดจนตัวอย่างมีลักษณะเป็นผงแป้ง นำผลตัวอย่างถ่ายลงใน microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2) เติม CTAB buffer ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมาจนกระทั่งเป็น emulsion นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาเป็นระยะ

3) เติม Phenol:chloroform/iso-amyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (1 volume) พลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายด้านบนอย่างเบาๆ ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่โดยใช้ micropipette

4) เติม 10 % CTAB solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (1/10 volume) พลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ

5) เติม Phenol:chloroform/iso-amyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (1 volume) พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ จนเป็น emulsion นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายด้านบนอย่างเบาๆ ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่โดยใช้ micropipette

6) เติม CTAB precipitation buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเพื่อตกตะกอน DNA นำตัวอย่างไปบ่นใน -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลาย (supernatant) ทิ้ง เก็บตะกอน (pellet) ด้านล่างไว้

7) เติม high salt TE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ เพื่อ rehydrate pellet ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

8) เติมแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ทำให้เย็นแล้ว ในปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลาย (supernatant) ทิ้ง เก็บตะกอนด้านล่างไว้ (pellet)

9) แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ทำให้เย็นแล้ว ผสมให้เข้ากันเบาๆ ในปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

แล้วเทสารละลาย (supernatant) ทิ้ง เก็บตะกอน (pellet) ด้านล่างไว้ คว่ำหลอด microcentrifuge เพื่อให้ตะกอนแห้ง ใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง

10) เติม 0.1XTE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-3 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

**ค) การตรวจสอบปริมาณ DNA**

นำ DNA ที่สกัดได้ มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ DNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทำการเจือจาง DNA 50 เท่าด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (DNA ต่อน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1:50) ผสม DNA 2 ไมโครลิตรกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 98 ไมโครลิตรลงในหลอด microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ เพื่อละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดปริมาณ DNA ใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตาไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของ DNA ตามวิธีของ Farrell (1993)

$$DNA(\mu g/\mu l) = Abs260 \times dilution \times 50$$

(dilution = dilution factor)

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ DNA โดยคำนวณค่าสัดส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260/280 (nm) หากมีค่า เท่ากับ 1.8 แสดงว่าสารละลาย DNA มีความบริสุทธิ์ ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนและฟีนอล และถ้าสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของ RNA

**1.2.3 ปฏิกิริยา PCR**

ทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer ชนิด RAPD ซึ่งมีลำดับเบสยาว 10 เบส โดยมีรายละเอียดของ primer การเตรียมปฏิกิริยา อุณหภูมิและเวลาของการปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

**ก) การคัดเลือก primer**

คัดเลือก primer จากบริษัท Bio Basic Incorporation ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (10 mer) จำนวน 33 ชนิด ดังนี้ OPB01, OPB03, OPB08 , OPB11,OPF06, OPB12, OPB15 OPB20, OPF02, OPF03, OPF04, OPF05,OPF07, OPF09, OPF10, OPF11, OPF13, OPF14, OPF15, OPG01, OPG03, OPG04, OPG05, OPG06, OPG09, OPG10, OPG11, OPG12, OPG15, OPG17, OPG18, OPC02 และ OPC20

**ข) องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR**

ปฏิกิริยามีองค์ประกอบดังนี้ DNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร buffer ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ 3 มิลลิโมลาร์ dNTP 200 ไมโครโมลาร์ primer 0.4 ไมโครโมลาร์ *Taq* polymerase 1 ยูนิต

**ค) เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition)**

ขั้นตอน pre denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 นาทีจำนวน 1 รอบ ขั้นตอน denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที primer annealingใช้อุณหภูมิ 42-44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที extension ใช้อุณหภูมิ

72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 นาที จำนวน 45 รอบ และ post extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 นาทีจำนวน 1 รอบ หลังเสร็จปฏิกิริยาแล้ว เก็บไว้ที่ 10 องศาเซลเซียส แล้วนำผลผลิต PCR มาเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปแยกด้วย gel electrophoresis ในขั้นตอนต่อไป

หมายเหตุ อุณหภูมิของ annealing ขึ้นอยู่กับชนิดของ primer และปริมาณของเบส C และ G

**1.2.4 agarose gel electrophoresis**

ก) การเตรียมแผ่น agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

1) ชั่ง agarose 0.8 กรัม ใส่ในบีกเกอร์แล้วเติม 1X TBE ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เพื่อละลายผง agarose ให้เข้ากันดีแล้วหลอมโดยใช้เตา microwave จนกระทั่งเป็นสารละลายใส (ภาคผนวก ก)

2) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส

3) เตรียมถาดสำหรับใส่เจลโดยทำความสะอาดถาดเจลและหวีเสียบ (comb) ให้สะอาดและประกอบเข้าชุดให้เรียบร้อยปรับระดับให้ได้แนวระนาบด้วยลูกน้ำ

4) วางหวีเสียบที่ปลายข้างหนึ่งของถาดเจลให้ห่างจากขอบ ประมาณ 1 เซนติเมตร เมื่อเจลแข็งตัวจะเกิดช่องเล็กๆ (well) สำหรับหยอดตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ

5) เทสารละลายเจลที่หลอม ลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้แผ่นเจลมีความหนา 5-7 มิลลิเมตร โดยไม่ให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

6) เท 1XTBE หล่อหน้าเจลก่อนที่จะดึงหวีออกเบาๆ อย่างระมัดระวัง นำถาดเจลใส่ลงใน chamber สำหรับทำ electrophoresis 1XTBE

ข) การ run gel

1) นำถาดเจลที่เตรียมไว้วางลงใน chamber โดยให้ด้านที่มี well อยู่ใกล้ขั้วลบ เท 1XTBE ลงใน chamber ให้ท่วมเจลพอสมควร (ให้ผิวเจลอยู่ใต้ 1XTBE buffer ประมาณ 1-3 มิลลิเมตร)

2) ผสม loading dye (ภาคผนวก ก) กับสารละลาย DNA ให้เข้ากัน load standard 100 bp ในช่องเจลที่ 1 แล้ว load PCR product ลงในช่องเจลจนครบ

3) ปิด chamber เปิดเครื่อง power supply แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าเครื่องที่จากขั้วลบไปขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

4) เตรียม Ethidium bromide

5) เมื่อแยก DNA ในเครื่อง electrophresis แล้ว นำแผ่น agarose ออกจาก chamber แล้วนำไปแช่ Ethidium bromide ที่เตรียมไว้ แล้วอยู่ในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที

6) นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต แล้วบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายเจล (Gene flash syngene bio imaging) เพื่อนำลายพิมพ์ DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างต่อไป

**1.3. การบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล**

ก) วิเคราะห์ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) version 2.10p โดยนำข้อมูลทางสัณฐานวิทยาทั้ง 22 ลักษณะมาแปลงให้เป็นข้อมูลแบบไบนารี่ โดยให้คะแนนของลักษณะโดยให้คะแนนของลักษณะทางสัณฐานที่เหมือนกันเป็น 1 ถ้าไม่ปรากฏให้เป็น 0 เพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ simple matching, Jaccard และ Dice coefficients และสร้าง dendrogram โดยใช้ Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)

ข) วิเคราะห์ข้อมูลจากลายพิมพ์ DNA โดยตรวจดูตำแหน่งของการเกิดแถบ DNA และไม่ปรากฏแถบ DNA ในแบบแผนลายพิมพ์ของงาแต่ละชนิด ซึ่งทำการบันทึกผลใช้ระบบตัวเลข คือการปรากฏแถบ DNA ให้สัญลักษณ์เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบ DNA ให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยบันทึกข้อมูลทุกตำแหน่งของแถบ DNA ในแต่ละ primer ที่ใช้ จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างงาแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ simple matching, Jaccard และ Dice coefficients และสร้าง dendrogram โดยใช้ Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)

ค) ตรวจสอบความถูกต้องของการจัดกลุ่มโดยใช้การวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation มีเกณฑ์ที่ใช้โดย Sirithunya *et al.* (2001) โดยถ้าค่า cophenetic correlation น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.7 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ไม่ดี ค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มได้ปานกลาง ค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดี และค่าอยู่ระหว่าง 0.9-1.0 เป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก

ง) ตรวจสอบความสัมพันธ์ของค่า similarity ที่ได้จาก simple matching, Jaccard และ Dice ของข้อมูลทางสัณฐานวิทยากับข้อมูลลายพิมพ์ DNA โดยการวิเคราะห์ simple correlation

**2. ระยะเวลาและสถานที่ทดลอง**

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 22 ลักษณะคือ ลักษณะใบติ่ง สีของใบเลี้ยง รูปร่างของใบเลี้ยง ก้านใบเลี้ยง จำนวนพู ตำแหน่งใบ ลักษณะขนฝัก ขนบนต้น มุมใบ รูปร่างของใบล่าง ขนของใบ การแตกกิ่ง การพัฒนาของต่อมน้ำหวานเป็นดอก การมีขนที่ดอก รูปร่างของฝัก ขนของฝัก สีของเมล็ด สีดอก สีของต่อมน้ำหวาน ลักษณะใบ ลักษณะเมล็ด และ สีของ faveola ทำการทดลองที่ แปลงทดลองหมวดพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระยะเวลาทดลอง เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือน ธันวาคม 2547

2. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA จาก PCR based markers ทำการทดลองที่ลองปฏิบัติการหมวดพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระยะเวลาทดลอง เดือนเมษายน 2547 ถึงเดือน สิงหาคม 2548