อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์ถั่วเหลือง

1.1 ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ได้จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ มีลักษณะประจำพันธุ์ดังนี้ ดอกมีสีขาว เมล็ดมีลักษณะกลมและมีขนาดใหญ่ เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีฟางข้าว hilum มีสีน้ำตาล น้ำหนัก 100 เมล็ดเฉลี่ยประมาณ 15 กรัม และไม่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (รัฐ, 2546)

1.2 ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ได้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย (AVRDC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม มีลักษณะประจำพันธุ์ดังนี้ ดอกมีสีม่วงเข้ม เมล็ดมีขนาดเล็ก เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีน้ำตาลเข้ม hilum มีสีน้ำตาลดำ มีลักษณะเมล็ดแข็ง น้ำหนัก 100 เมล็ดเฉลี่ยประมาณ 10 กรัม และต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (รัฐ, 2546)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์ ได้แก่ ปากคีบ ป้ายกระดาษ ดินสอ จานแก้ว สำลี และแอลกอฮอล์

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกถั่วเหลือง ได้แก่ กระถาง ดิน ไม้ปักหลัก ปุ๋ย และสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืช ได้แก่ ถุงพลาสติก กรรไกร ปากกา กระติกน้ำแข็ง

2.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

2.4.1 ตู้แช่ –20 องศาเซลเซียส รุ่น F2-189GYN (SANYO)

2.4.2 เครื่องอิเลคโทรโฟรีซีส รุ่น SEQ-2050 (SCIE-PLAS)

2.4.3 เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation) รุ่น DP-001.FDC (Viber Lormat)

2.4.4 เครื่อง vortex รุ่น VX 100 (LABNET)

2.4.5 เครื่องบ่ม (water bath) รุ่น Isotemp 210 (Fisher Scientific)

2.4.6 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ (PCR) รุ่น PTC-100™ (MJ Research,Inc.)

2.4.7 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205 (Denver Instrument Company)

2.4.8 ชุด sequencing gel รุ่น E90697 (Scia-Plas)

2.4.9 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น E833 (Scia-Plas)

2.4.10 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autocave) รุ่น AMA 2405 (ASTELL)

2.4.11 เครื่องปั่นแยกสาร (centrifuge) รุ่น Sigma 210 (LABORZENTRIFUGEN GmbH)

2.4.12 เครื่องวัดความเป็นกรด- ด่าง (pH meter)

2.4.13 โกร่งบดตัวอย่างพืช

2.4.14 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ รุ่น CALIBRA 822 (SOCOREX) และ ทิป (tip)

2.4.15 หลอดใส่สาร (microtube) ขนาด 50, 15, 1.5, 0.5, 0.2 มิลลิลิตร

2.4.16 เครื่องแก้ว

2.4.17 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร กระดาษติดป้าย แผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์ ฟิล์มถ่ายรูป

2.5 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาคุณภาพเมล็ดพันธุ์

2.5.1 เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity meter) รุ่น JENWAY 4010

2.5.2 เครื่องชั่งสารทศนิยม 3 ตำแหน่ง

2.5.3 ตู้อบลมร้อน (hot air-oven)

2.5.4 ตู้เพาะ hotpack 35260 และ WTB brinder รุ่น VAP2

2.5.5 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ หลอดทดลอง, บีกเกอร์ ,แผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์, ปากคีบ, มีด

3. <u>สารเคมี</u>

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3.1.1 ไนโตรเจนเหลว

3.1.2 extraction buffer ประกอบด้วย100 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane(pH 7.5), 50 mM ethylenediamine tetraacetic acid di-sodium salt (EDTA-di-soduim salt) (pH 8.0), 500 mM NaCl, 1.25% sodium dodecyl sulphate (SDS) และ10 mM 2-mercaptoethanol)

3.1.3 potassium acetate

3.1.4 cholroform : octanol (24 :1)

3.1.5 isopropanol

3.1.6 ethanol 65, 70, 85 เปอร์เซ็นต์

3.1.7 chloroform : phenol (1:1)

3.1.8 sodium acetate

3.1.9 RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.10TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 1 mM EDTA pH 8.0)

3.2 สารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction หรือ PCR)

3.2.1 10 x buffer

3.2.2 dNTP (2.5mM)

3.2.3 $MgCl_2$ (25 mM)

3.2.4 ไพรเมอร์ (1 μM)

3.2.5 *Taq* DNA polymerase (5 U/μl)

3.2.6 ดีเอ็นเอ (50 ng/μl, 25 ng//μl)

3.2.7 น้ำกลั่น

3.3 สารเคมีสำหรับการทำอิเลคโทรโฟรีซิสด้วย agarose gel

3.3.1 agarose gel

3.3.2 tris base

3.3.3 0.5 M EDTA

3.3.4 boric acid

3.3.5 HCl

3.3.6 bromophenol blue

3.4. สารเคมีสำหรับการทำอิเลคโทรโฟรีซิสด้วย denaturing polyacrylamide gel

3.4.1 bind silane (Plusone)

3.4.2 repel silane (Plusone)

3.4.3 glacial acetic acid (Merck)

3.4.4 ethanol 95 เปอร์เซ็นต์

3.4.5 acrylamide gel และ methybisacrylamide (Plusone)

3.4.6 TBE buffer

3.4.7 urea (USB)

3.4.8 10% APS (ammonium persulfate)

3.4.9 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine)

3.4.10 AFLP loading dye (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol, 0.1% bromophenol blue)

3.4.11 developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร sodium thiosulfate)

3.4.12 silver nitrate (Merck)

3.4.13 น้ำกลั่น

วิธีการ

1. การสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 และประชากรลูกชั่วที่ 2

1.1 การผลิตเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ทำโดยการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ เชียงใหม่ 60 ที่ไม่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่และให้ทำหน้าที่เป็นพันธุ์แม่กับพันธุ์ GC 10848 ที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่และให้ทำหน้าที่เป็นพันธุ์พ่อ วิธีการผสมเกสรทำได้ดังนี้

ก. การกำจัดเกสรตัวผู้ (emasculation) ของพันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 กระทำในตอนเช้าช่วงเวลา 7.00 น. – 8.00 น. โดยเลือกดอกที่พร้อมจะบานในวันรุ่งขึ้น กลีบดอกโผล่ให้เห็นเพียงเล็กน้อย ใช้ปากคีบปลายแหลมซึ่งทำความสะอาดด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์แล้ว ดึงกลีบดอกจากส่วนด้านบนลงมาสู่ด้านล่างทีละกลีบจนหมด จากนั้นก็ดึงเกสรตัวผู้ซึ่งอยู่รอบๆเกสรตัวเมียทั้งหมด 10 อันออก ระวังอย่าให้เกสรตัวเมียบอบช้ำเพราะจะทำให้ผสมไม่ติด โดยทั่วไปจะเตรียมดอกตัวเมีย 1- 2 ดอกใน 1 ช่อ เพื่อการผสมพันธุ์

ข. การถ่ายละอองเกสรตัวผู้ (pollination) ช่วงเวลาที่เหมาะสมคือ 8.00 – 10.00 น. เก็บดอกถั่วเหลืองจากพันธุ์พ่อ GC 10848 ที่บานเต็มที่ในตอนเช้า สีของดอกยังคงสดใสอยู่ ดึงเอาส่วนที่เรียกว่า standard และ wing ออกเหลือเฉพาะส่วนของ keel ซึ่งภายในมีอับละอองเกสรและส่วนของเกสรตัวเมียอยู่ นำส่วนปลายของเกสรตัวผู้ไปแตะลงบนยอดเกสรตัวเมียที่ทำลายเกสรตัวผู้แล้ว ติดป้ายบอกคู่ผสมและวัน เดือน ปีที่ผสมเกสร หลังจากถ่ายละอองเกสร 1 วัน ถ้าผสมไม่ติดดอกจะร่วง แต่ถ้าผสมติดจะเห็นฝักอ่อนสีเขียว เมื่อฝักแก่เก็บเกี่ยวเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1

1.2 การปลูกต้นลูกผสมชั่วที่ 1 นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 มาปลูกเป็นต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ในเรือนปลูกพืชทดลองตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR

1.3 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมาย SSR

1.3.1 เก็บตัวอย่างใบจากต้นลูกผสมชั่วที่ 1 มาสกัดดีเอ็นเอโดยประยุกต์วิธีการของ Dellaporta *et al.*(1983) ดังนี้

ก. บดตัวอย่างใบอ่อนถั่วเหลืองประมาณ 1 กรัม ให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติม extraction buffer ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในโกร่ง ผสมให้เข้ากัน แล้วตักใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง vortex

ข. บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

ค. เติม 5 M potassium acetate 300 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็งนาน 1 ชั่งโมง

ง. เติม chloroform : octhanol (24 : 1) 300ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

จ. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ฉ. ดูดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 15 มิลลิลิตร

ช. เติม isopropanol ที่เย็นเป็นปริมาณ 2 เท่าของสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ซ. เกี่ยวดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้วปลายงอขนาดเล็ก ล้างด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไป spindown โดยทำซ้ำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง

ฌ. ผึ่งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

ญ. เติม chloroform : phenol (1:1) 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

ฎ. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

ฏ. ดูดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

ฐ. เติม 3 M CH_3COONa 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

ฑ. เติม ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็น 1 มิลลิลิตร

ฒ. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร นำไป spindown โดยทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง

ณ. ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาตร 50-200 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอที่ได้

1.3.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค SSR

ก. นำสารละลายดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 มาปรับความเข้มข้นให้เป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 2-5 เบส ซ้ำๆ จำนวน 4 ชนิด (ตารางที่1)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SSR

ชนิดไพรเมอร์	Sense primer	Antisense primer
SOYHSP176 $(AT)_n$	ttttgttaagttactgtactgtgg	tattttagcagttttagatgattcg
SOYSC514 $(AT)_n$	ctacatgacacaattcttagggacc	tggaaatcagtggaatatgtgaagc
SOYPRP1 $(ATT)_n$	aagaggtacgtgccaaattacatca	atcttgttagaaaactccgcccaca
SAT43 $(AT)_n$	aaattctgttcattgtccgtc	cattttaatatcccgagtagg

ข. เตรียมสารเคมี (ตารางที่ 2) สำหรับใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเทคนิค SSR

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1.00
10x PCR buffer	1.25
dNTP (2.5 mM)	0.50
$MgCl_2$ (25mM)	1.00
Primer sense (1 ไมโครโมลาร์)	1.25
Primer antisense (1 ไมโครโมลาร์)	1.25
Taq polymerase (5 หน่วย/ไมโครลิตร)	0.10
น้ำกลั่นบริสุทธ์	6.15
รวม	12.50

ค. ผสมสารต่างๆที่เตรียมไว้ในข้อ ข. ให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	3 นาที
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	30 วินาที
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	56	องศาเซลเซียส	30 วินาที
ขั้นที่ 4	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	1 นาที

ทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 2 - 4 จำนวนรอบ 35 รอบ

ขั้นที่ 5	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	10 นาที
ขั้นที่ 6	อุณหภูมิ	4	องศาเซลเซียส	

ง. นำผลผลิตที่ได้มาแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยการทำอิเลคโทรโฟรีซีสด้วย denaturing polyacylamide gel

1.4 การสร้างประชากรลูกชั่วที่ 2 ทำโดยปล่อยให้ต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดลูกชั่วที่ 2 ไปปลูกเป็นประชากรลูกชั่วที่ 2 ในแปลงปลูกพืชทดลองเพื่อดูการกระจายตัว (segregation) ของลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในประชากร

2. <u>การประเมินการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดในสภาพไร่ของประชากรลูกชั่วที่ 2</u>

ประเมินการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของประชากรลูกชั่วที่ 2 โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

2.1 การตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพเมล็ดพันธุ์ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ถูกควบคุม (incubator weathering) เก็บฝักถั่วเหลืองที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาโดยเก็บแยกต้น นำฝักมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ นาน 7 วัน จากนั้นนำฝักมาผึ่งลมจนแห้ง นวดเมล็ดออกจากฝักด้วยมือ เพาะเมล็ดจำนวน 25 เมล็ด (ทำ 3 ซ้ำ) บนกระดาษเพาะที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่น ม้วนกระดาษหลวมๆแล้วนำไปใส่กล่องพลาสติก นำไปวางในตู้เพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นประเมินความงอกโดยนับจำนวนต้นกล้าที่งอกปกติ (ISTA, 1985)

2.2 การวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ด โดยชั่งน้ำหนักเมล็ด 25 เมล็ด (ทำ 3 ซ้ำ) นำเมล็ดไปแช่ในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดปากบีกเกอร์ด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ด (AOSA, 1983)

2.3 การหาเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ด ทำโดยการสุ่มเมล็ดที่ระยะสุกแก่เก็บเกี่ยวมา 10 เมล็ด นำเมล็ดมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำเมล็ดไปแช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 15-16 ชั่วโมง แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกจากเมล็ด นำเปลือกหุ้มเมล็ดและเมล็ด (ที่ไม่มีเปลือกหุ้ม) ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง (กรณีที่มีเมล็ดแข็งให้ใช้มีดกรีดที่เปลือกหุ้มเมล็ดแล้วแช่น้ำต่อไป) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ด} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของเปลือกหุ้มเมล็ด}}{\text{(น้ำหนักแห้งของเมล็ด)}} \times 100$$

3. <u>การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม</u>

3.1 สกัดดีเอ็นเอจากประชากรลูกชั่วที่ 2 ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 1.3.1

3.2 วิเคราะห์หาปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยทำให้สารละลายดีเอ็นเอเจือจางลง 100 เท่า (ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตรในน้ำกลั่น 297 ไมโครลิตร) นำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งสารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A260) เท่ากับ 20 หน่วย absorbance (A260) ดังนั้นสามารถคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอหรือกรดนิวคลีอิกได้จากสูตรดังนี้

ปริมาณกรดนิวคลีอิก = A_{260} x 1/20 หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณกรดนิวคลีอิก = A_{260} x 1/20 x 1000 = A_{260} x 50 หน่วยเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ดังนั้นสารละลายดีเอ็นเอเจือจาง 100 เท่า สามารถคำนวณปริมาณกรดนิวคลิอิกหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตรได้ = A_{260} x 50 x 100

เมื่อทราบปริมาณสารละลายดีเอ็นเอของประชากรลูกชั่วที่ 2 แต่ละตัวอย่างแล้วปรับปริมาณดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ให้เท่ากันทุกตัวอย่างเพื่อรวมดีเอ็นเอ

3.3 แบ่งประชากรลูกชั่วที่ 2 ออกเป็น 2 กลุ่มโดยพิจารณาจากผลการประเมินการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ คือ กลุ่มที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพจำนวน 12 ต้นกับกลุ่มที่

อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพจำนวน 12 ต้น รวมสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นลูกชั่วที่ 2 ในแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกัน (bulked DNA)

4. <u>การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD</u>

4.1 นำสารละลายดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และจากข้อ 3.3 มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 200 ชนิด (ตารางที่ 3) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งทำได้โดยการเตรียมสารต่างๆ (ตารางที่ 4) สำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผสมสารต่างๆเข้าด้วยกัน จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	3 นาที
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	36	องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 4	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	1.30 นาที
ทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 2-4 จำนวนรอบ 39 รอบ				
ขั้นที่ 5	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	5 นาที
ขั้นที่ 6	อุณหภูมิ	4	องศาเซลเซียส	

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD จำนวน 200 ชนิด

ชุดไพรเมอร	หมายเลขลำดับไพรเมอร์	บริษัท
AA	01, 03, 07, 09, 11, 16, 18, 19, 20	Operon Technologies
AB	01, 04, 05, 06, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 20	Operon Technologies
AC	02, 03, 05, 07, 08, 09, 10, 13, 14, 15, 19	Operon Technologies
AD	02, 03, 05, 06, 11, 19, 20	Operon Technologies
AF	04, 06, 07	Operon Technologies
AH	01, 02, 09, 11, 12, 16, 17, 18, 19	Operon Technologies
AI	05, 08, 11, 12, 13, 14, 15, 16	Operon Technologies
AP	11	Operon Technologies
APG	03	Operon Technologies
APW	01, 02	Operon Technologies
OPA	02, 03, 04. 05, 07, 08, 09, 11, 13, 14, 16, 18, 19	Operon Technologies
OPB	02, 06, 08	Operon Technologies
OPC	02, 03, 05, 06, 07, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20	Operon Technologies
OPD	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPE	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPF	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPH	02	Operon Technologies
OPI	03, 04, 10, 12, 14, 18	Operon Technologies
OPJ	05	Operon Technologies
OPK	02, 14, 16	Operon Technologies

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชุดไพรเมอร์	หมายเลขลำดับไพรเมอร์	บริษัท
OPL	12, 13, 19	Operon Technologies
OPN	03, 04, 14, 20	Operon Technologies
OPR	02, 03, 05	Operon Technologies
OPV	01	Operon Technologies
OPX	04, 05	Operon Technologies
OPV	02, 03	Operon Technologies
O	08	Bioprobe
PRP	01, 02	Chen *et al*. 1997
RSR	01, 02, 03	Chen *et al*. 1997
TPXR	01, 02	Chen *et al*. 1997
RS	01	Chen *et al*. 1997
U.B.C.	01, 02, 03, 04, 05, 06 ,07, 08 ,09 10, 11, 12, 13,14	University of British Columbia

ที่มา : Thseng *et al*. (1999)

ตารางที่ 4 สารเคมีและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเทคนิค RAPD

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1.00
10x PCR buffer	1.50
dNTP (2.0 mM)	1.50
$MgCl_2$ (25mM)	1.50
ไพรเมอร์ (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1.00
Taq polymerase (5 หน่วย/ไมโครลิตร)	0.10
น้ำกลั่นบริสุทธ์	8.40
รวม	15.00

4.2 นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยการทำอิเลคโทรโฟรีซีสด้วย agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer โดยผสมดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตรกับ loading buffer 2 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงบน agarose gel โดยใช้ Lambda DNA marker เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 110 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง และย้อมด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสง UV เพื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ผลต่อไป

5. <u>การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP</u>

5.1 นำสารละลายดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ, พันธุ์แม่ และจากข้อ 3.3 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco*RI มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส (G/AATTC) และ *Mse*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส (T/TTA) และเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย adapter 2 ชนิด คือ

*Eco*RI adapter 5’-CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA-3’

*Mse*I adapter 5’-GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT-3’

ในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์และต่อดีเอ็นเอด้วย adapter จะทำในหลอดเดียวกันโดยจะผสมสารต่างๆ (ตารางที่ 5) ในหลอดเดียวกัน แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อกับ adapter

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2.50
เอนไซม์ *Eco*RI (5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.25
เอนไซม์ *Mse*I (5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.50
10x PCR buffer R^+	2.50
*Eco*RI adapter (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1.00
*Mse*I (25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	2.00
10x T_4 ligase buffer	5.00
T_4 DNA ligase (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	0.20
น้ำกลั่นบริสุทธ์	36.05
รวม	50.00

5.2 การทำ preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (ตารางที่ 6) ซึ่งทำได้โดยการผสมสารต่างๆในตารางที่ 7 เข้าด้วยกัน แล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 1 นาที
ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
ทำตามขั้นตอน 1-3 จำนวน 24 รอบ
ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้เจือจางลง 20 เท่า ด้วย TE buffer เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 ลำดับเบสของ primer + 1 ที่ใช้ในการทำ preselective amplification และ primer + 3 ที่ใช้ในการทำ selective amplification

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส
*Eco*RI primer + 1 (E-A)	5'-GACTGCGTACCAAATTCA-3'
*Mse*I primer + 1 (M-C)	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
*Eco*RI primer + 1 (E-C)	5'-AGACTGCGTACCAATTCC-3'
*Mse*I primer +1 (M-A)	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAA-3'
*Eco*RI primer + 3 (E-A)	5'-GACTGCGTACCAAATTCAAC-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCAAG-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCACA-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCACC-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCACG-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCACT-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCAGC-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCAGG-3'
*Mse*I + 3 primer (M-C)	5'GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
	5'GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
	5'GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
	5'GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
	5'GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
	5'GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
	5'GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'
	5'GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'
*Eco*RI primer + 3 (E-C)	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAG-3'
	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAC-3'

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส
*Eco*RI primer + 3 (E-C)	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAA-3'
*Mse*I + 3 primer (M-C)	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAAG-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAAT-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAGA-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAGG-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAACG-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAATA-3'

ตารางที่ 7 ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในการทำ preselective amplification

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอจากตารางที่ 5.1 (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2.50
10X PCR buffer	2.50
$MgCl_2$ (50mM)	0.75
dNTP (2mM)	2.50
Taq DNA polymerase (5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.10
*Eco*RI primer +1 (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร	1.00
*Mse*I primer +1 (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1.00
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	15.15
รวม	25.00

5.3 การทำ selective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 เบสที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (ตารางที่ 6) เพื่อลดจำนวนผลผลิตดีเอ็นเอของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำได้โดยการผสมสารต่างๆในตารางที่ 8 ให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที
ขั้นที่ 3 ลดอุณหภูมิในขั้นตอนที่ 2 ลงรอบละ 1 องศาเซลเซียส จำนวน 9 รอบ
ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที
ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 4 - 6 จำนวน 35 รอบ

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำผลผลิตที่ได้มาเติม AFLP loading buffer (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue และ 0.1% xylene cyanol) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อนำไปทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 8 สารเคมีและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในการทำ selective amplification

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	5.00
10X PCR buffer	2.00
$MgCl_2$ (50mM)	0.60
dNTP (2mM)	2.00
Taq DNA polymerase (5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.10
*Eco*RI primer +3 (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร	1.00
*Mse*I primer +3 (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1.00
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	8.30
รวม	20.00

6. <u>การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเลคโทรโฟรีซีสด้วย denaturing polyacrylamide gel</u>

วิธีการแยกดีเอ็นเอโดยการทำอิเลคโทรโฟรีซีสด้วย denaturing polyacrylamide gel ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Caetano-Anolles *et al.* (1997) ดังนี้

6.1 เตรียมกระจกสำหรับเทเจล โดยเช็ดกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่ายด้วย repel silene เพื่อไม่ให้เจลติดกระจกปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที และกระจกแผ่นหลังด้วย bind silene (bind silene 1 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) หลังจากนั้นนำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าด้วยกันโดยวาง spacer ไว้ทั้ง 2 ข้างของกระจกเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่น

6.2 เตรียม acrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนประกอบดังนี้ ยูเรีย 27 กรัม, 10x TBE buffer 6 มิลลิลิตร APS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 600 ไมโครลิตร acrylamide gel ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide gel ความเข้มข้น 29 เปอร์เซ็นต์ และ methylene bisacrylamide ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) 12 มิลลิลิตร TEMED 32 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 21 มิลลิลิตร เทเจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้ง 2 จนเต็มแล้วใส่หวีลงไปด้านบน ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

6.3 นำเจลที่แข็งตัวแล้วมาประกอบเข้ากับเครื่อง sequencing gel เพื่อทำ pre-run (ใช้กระแสไฟฟ้า 110 W นาน 30 นาที) เติม 1x TBE buffer ลงในช่องด้านบน

6.4 ล้างผิวหน้าเจลด้วย 1x TBE buffer ก่อนหยอดตัวอย่างลงไปในช่อง จากนั้นหยอดตัวอย่างลงไปในช่องปริมาตร 15 ไมโครลิตรจนครบทั้งหมด แล้วเปิดเครื่องเพื่อทำการ run โดยใช้กระแสไฟฟ้า 110 W นาน 3 ชั่วโมง

7. <u>การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท</u>

7.1 นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่ในสารละลาย fixative (acetic acid ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 20 นาที เขย่าเป็นระยะๆ

7.2 นำกระจกที่เจลติดอยู่มีมาล้างด้วยน้ำกลั่น 30 นาที (บนเครื่องเขย่า) แล้วล้างต่อด้วยน้ำกลั่นอีก 5 นาที

7.3 ย้ายกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่ในซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

7.4 นำกระจกมาแช่ใน developer (sodium carbonate 2.5 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ sodium thiosulfate 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่แช่เย็น จนเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏ

7.5 หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาแช่ใน stop solution (acetic acid 5 เปอร์เซ็นต์ และ glycerol 3 เปอร์เซ็นต์) นาน 5 นาที แล้วล้างต่อด้วยน้ำกลั่นอีก 10 นาที นำแผ่นเจลมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำผลมาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

8. <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

8.1 บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของแต่ละคู่ไพรเมอร์ คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพ่อแม่ แล้วพิจารณาแถบดีเอ็นเอของกลุ่มที่ต้านทาน (bulk resistance) กับกลุ่มที่อ่อนแอ (bulk susceptible) ต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ โดยให้คะแนน “ 1” เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น “ 0 ” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

8.2 คำนวนหาเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมโดยพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างซึ่งจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบในพืชชนิดหนึ่งแต่ไม่พบในพืชอีกชนิดหนึ่ง เนื่องมาจากความแตกต่างของตำแหน่งจุดตัดในดีเอ็นเอเป็นผลทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันในพืชแต่ละชนิด จากนั้นนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างที่เกิดขึ้นทั้งหมดในพืชแต่ละชนิดแล้วนำไปหารด้วยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด

9. <u>สถานที่ทำการทดลอง</u>

1. เรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
2. ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
3. ห้องปฏิบัติการทางด้านเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

10. <u>ระยะเวลาทำการทดลอง</u>

การทดลองนี้เริ่มตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2546 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2549