

## วิธีการวิจัย

### 1. การผสมพันธุ์ (Hybridization)

1.1 ทำการผสมข้ามแบบพบกันหมด (Diallele crosses) ของลำดับประด 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ปัตตาเวีย (Pattavia, PV) พันธุ์ภูเก็ต (Phuket, PK) และลำดับประดตัดแปรพันธุกรรม (Transgenic pineapple, TP) จำนวน 6 คู่ ดังนี้

1.1.1 Transgenic pineapple (TP) x Pattavia (PV)

1.1.2 Transgenic pineapple (TP) x Phuket (PK)

1.1.3 Pattavia (PV) x Transgenic pineapple (TP)

1.1.4 Phuket (PK) x Transgenic pineapple (TP)

1.1.5 Phuket (PK) x Pattavia (PV)

1.1.6 Pattavia (PV) x Phuket (PK)

1.2 การผสมตัวเอง (Self) ของแต่ละพันธุ์มีจำนวน 3 พันธุ์ ดังนี้

1.2.1 พันธุ์ปัตตาเวีย (Pattavia, PV)

1.2.2 พันธุ์ภูเก็ต (Phuket, PK)

1.2.3 ลำดับประดตัดแปรพันธุกรรม (Transgenic pineapple, TP)

### 2. การเพาะเมล็ดลูกชั่วที่ 1 ( $F_1$ )

เก็บผลสุกและเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 โดยเก็บผลสุกที่ได้จากการผสมทุกคู่ผสมในข้อที่ 1.1 และ 1.2 แล้วแกะเมล็ดที่ได้แยกเป็นเมล็ดของแต่ละคู่ผสม นำเมล็ดที่ได้จากแต่ละคู่ผสมมาเพาะเมล็ด โดยการแช่เมล็ดด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น นาน 60 วินาทีเพื่อกัดเปลือกเมล็ดให้บาง แล้วล้างกรดด้วยการล้างในน้ำไหล นำไปเพาะในกระบะทราย ประมาณ 1 เดือน เมล็ดจะงอก หลังจากนั้นย้ายต้นอ่อนลงถุงดำขนาดเล็กที่ผสมดินและขุยมะพร้าวเมื่อลำดับประดอายุประมาณ 5 อาทิตย์หลังเพาะเมล็ด และเลี้ยงต้นอ่อนในเรือนเพาะชำ ตามวิธีที่ Sripaoraya (2009) รายงานไว้ เลี้ยงจนต้นมีขนาดครึ่งฟุตคืออายุประมาณ 6 เดือนหลังย้ายลงถุงดำ แบ่งต้นลำดับประดออกเป็น 3 กลุ่ม เพื่อการดังนี้

2.1 เพื่อใช้ในการทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup>

2.2 เพื่อใช้ในการปลูกแล้วทำการผสมตัวเองของลูกผสม  $F_1$  เพื่อดูการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสไปสู่ลูกชั่วที่ 2 ( $F_2$ )

2.3 เพื่อให้ในการปลูกคัดเลือกลูกผสม  $F_1$  ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> และให้ผลผลิตและคุณภาพดี

3. การตรวจสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> ของสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$  Plants) โดย;

### 3.1 การตรวจสอบโดยใช้สารเคมี X-Gluc

ทำการตรวจสอบยีนรายงานผล (ยีน *gus*) ในใบของต้นอ่อนสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีอายุ 5 เดือนหลังเพาะเมล็ดและมีความสูงของต้น 2 ซม. โดยตรวจสอบสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ทุกต้นที่ได้จากการผสมจากพ่อหรือแม่ที่เป็นสับปะรดตัดแปรพันธุกรรม โดยนำใบสับปะรดบ่มในสารละลาย X-Gluc ตรวจสอบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น ใช้ Chi-square Test ทดสอบความแตกต่างของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชของสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 นำต้นสับปะรดที่เป็นผลจากการทำการตรวจสอบกับยีนรายงานผลแล้วเป็นบวกคือมีสีน้ำเงิน มาใช้ในการตรวจสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> และผสมตัวเองเพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 2 ต่อไป

### 3.2 การตรวจสอบโดยใช้สารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup>

ทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชของต้นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เลี้ยงในเรือนเพาะชำ 6 เดือนหลังย้ายลงถุงดำ โดยต้นสับปะรดมีความสูงประมาณครึ่งฟุต ในคู่ผสม (PV x TP) และ (TP x PV) ใช้ต้นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ให้ผลเป็นบวกคือใบสับปะรดติดสีน้ำเงินเมื่อตรวจสอบกับสารเคมี X-gluc ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design; CRD) มี 4 ซ้ำ โดยใช้สับปะรดจำนวน 25 ต้นต่อหน่วยทดลอง (experimental unit) มีชนิดของคู่ผสมเป็นสิ่งทดลองซึ่งมี 4 คู่ผสมคือ (PV x TP), (TP x PV), (PV x PK) และ (PK x PV) และสับปะรดพันธุ์ภูเก็ต (PK), พันธุ์ปัตตาเวีย (PV), สับปะรดตัดแปรพันธุกรรม (TP) เป็นตัวเปรียบเทียบ รวมสิ่งทดลองทั้งหมด 7 สิ่งทดลอง ใช้สารกำจัดวัชพืชโบลาลฟอสที่มีชื่อการค้าว่าบาสต้า-เอกซ์ (Basta X<sup>®</sup>) ในอัตราที่แนะนำคือ 400 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อไร่ ตรวจสอบความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> หลังการฉีดพ่นที่ 3, 7 และ 14 วัน

#### 4. การผสมตัวเองของลูกผสมชั่วที่ 1 และการผสมกลับ (backcross) ไปยังพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

ย้ายต้นสืบประวัติลูกผสมชั่วที่ 1 ลงถุงดำขนาดใหญ่ เพื่อให้มีการเจริญเติบโตที่มากขึ้น ทำการใส่ปุ๋ยลงดินสูตร 15-15-15, ปุ๋ยยูเรีย, ให้ปุ๋ยทางใบ และกำจัดวัชพืช ย้ายต้นสืบประวัติชั่วที่ 1 ต้นที่มีขนาดความสูงประมาณ 20 เซนติเมตรทุกต้น และต้นที่มีความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบล่าฟอส จากการฉีดพ่นสารสารเคมีกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> จากเรือนเพาะชำลงปลูกที่แปลงทดลอง ทำการใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15, ปุ๋ยสูตร 46-0-0, ให้ปุ๋ยทางใบ และกำจัดวัชพืช ในเดือนที่ 3 และเดือนที่ 6 หลังจากย้ายลงปลูกในแปลง หยอดฮอริโมนที่ยอดสืบประวัติลูกผสมชั่วที่ 1 ในต้นที่มีขนาด 2 กิโลกรัมขึ้นไปเพื่อกระตุ้นให้สืบประวัติออกดอก ใส่ปุ๋ยสูตร 13-13-21 เมื่อสืบประวัติเริ่มออกดอก

##### 4.1 ทำการผสมตัวเองของลูกผสมชั่วที่ 1

ทำการผสมตัวเองของลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อให้ได้เมล็ดชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub> seed) และใส่ปุ๋ยสูตร 13-13-21 อีกครั้งหลังสืบประวัติติดผล 2 เดือน

##### 4.2 ผสมกลับ (backcross) ไปยังพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

เป็นการทำเพิ่มเติมเนื่องจากสืบประวัติเป็นพืชที่มีการป้องกันการผสมตัวเองตามที่ Bhowmik and Bhagabat (1975) และ Coppens d' Eeckenbrugge *et al.* (1993) รายงานไว้ เพื่อให้ได้สืบประวัติชั่วที่ 2 มาศึกษาการถ่ายทอดยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบล่าฟอสลงในสืบประวัติพันธุ์ที่ใช้ปลูกเป็นการค้า เพื่อพิสูจน์ความเป็น Hemizygous ของ bar gene ตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นจากการประชุม "นักวิจัยรุ่นใหม่..พบ..เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9 เป็นการศึกษาอีกวิธีหนึ่งหากมีการเกิดการป้องกันการผสมตัวเอง (self incompatibility) ของสืบประวัติชั่วที่ 1

#### 5. การคัดเลือกสืบประวัติลูกผสมชั่วที่ 1 และการเพาะเมล็ดชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub> seed)

บันทึกลักษณะทางเขตรกรรมของสืบประวัติชั่วที่ 1 เช่นลักษณะการมีหนามของใบ ลักษณะสีใบ การเรียงตัวและการตั้งตรงของใบ ลักษณะความต้านทานโรคไส้เน่า จำนวนหน่อต่อต้น จำนวนตะเกียง เก็บผลสุกสืบประวัติลูกผสมชั่วที่ 1 จากทั้งต้นที่ผสมตัวเองชั่วที่ 1 และต้นที่ไม่ผสมตัวเอง มาตรวจทดสอบคุณภาพผลของลูก F<sub>1</sub> โดยตรวจทดสอบลักษณะเปอร์เซ็นต์ความหวาน (เปอร์เซ็นต์ Brix) ความหอม ความกรอบ ความแน่นของเนื้อ สีผล ความกว้าง ความยาวของผล ความกว้างของแกนผล ความลึกของตา (Blossom cup)



### 5.1 คัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 1

คัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไโกลาฟอสและที่ให้ลักษณะทางเขตรกรรมที่ต้องการ โดยเลือกต้นที่ใบไม่มีหนามหรือมีหนามเฉพาะปลายใบ ลักษณะใบตั้งตรง มีความต้านทานโรค และมีคุณภาพผลดี

### 5.2 เพาะเมล็ด $F_2$

โดยแกะเอาเมล็ดชั่วที่ 2 ( $F_2$  seed) มาจากผลลับประดที่ถูกรับทำการให้ผสมตัวเอง และการผสมกลับมาเพาะโดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2

## 6. การตรวจสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชของลูก $F_2$

ทำการตรวจสอบยืนยันรายงานผลโดยใช้สารเคมี X-Gluc และมีวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1

## 7. การตรวจสอบการคงอยู่และการแสดงออกของยีน *Bar* ในลูก $F_2$

เพื่อตรวจสอบความเสถียรและการแสดงออกของยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไโกลาฟอสในต้นลับประดัดชั่วที่ 2 จึงทำการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ RT-PCR

### 7.1. การตรวจสอบยีน *bar* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการตรวจสอบยืนยันรายงานผล (ยีน *gus*) ในใบของต้นลับประดชั่วที่ 2 ที่ต้องการใช้วิเคราะห์ระดับโมเลกุล โดยนำใบลับประดบ่มในสารละลาย X-gluc ตรวจสอบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นเมื่อผลการตรวจสอบจากข้อ 6 กับยืนยันรายงานผลเป็นบวก จึงทำการสกัดดีเอ็นเอและนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการตรวจสอบหายีน *bar* ซึ่งมีขนาด 460 bp โดยใช้ primer *bar* forward 5'-GGTCTGCACCATCGTCAAC-3' และ primer *bar* reverse 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3' แต่ละปฏิกิริยาของ PCR ประกอบด้วย DNA ต้นแบบเข้มข้น 20 ng primer อย่างละ 3  $\mu$ l 10xBuffer 2.5  $\mu$ l 10mM dNTP 0.5  $\mu$ l 50mM  $MgCl_2$  0.5  $\mu$ l และ Taq DNA polymerase 0.5  $\mu$ l ในกรณี negative control จะใช้น้ำ deionized แทนดีเอ็นเอต้นแบบ หลังจากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่อง Genius Thermal Cycler (Techne, Cambridge, U.K.) โดยตั้งโปรแกรมเครื่องไว้ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ตามด้วย 52 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ตามด้วย 52 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72

สำนักวิชา คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
ห้องสมุด : วิจัย  
วันที่..... 2 ก.ค. 2555 .....

เลขทะเบียน..... 245897 .....

เลขเรียกหนังสือ.....

องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 3 วินาที จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และคงอุณหภูมิที่ 8 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

นำ PCR Products ที่ได้จาก PCR amplification มาวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี gel electrophoresis โดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer แล้ว 100 มิลลิลิตร ส่วนการเตรียมตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ โดยผสมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร และ 6x tracking dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder marker (Invitrogen, UK) จากนั้นทำการหยอดตัวอย่างลงในเจล และนำไปแยกดูขนาดของแถบดีเอ็นเอ ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 10 นาที ดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องดูแถบดีเอ็นเอ แล้วถ่ายรูปด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Vilber Lour mat)

## 7.2. การตรวจสอบ mRNA ของยีน *bar* ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)

7.2.1. การสกัดอาร์เอ็นเอ ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบสับประดขั้วที่ 2 ที่เป็นทั้งต้นที่เป็น GUS positive และ ต้นที่เป็น GUS negative โดยใช้ RNeasy®Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) ใช้ใบสับประดหนักประมาณ 50 มิลลิกรัม มาบดในครกที่มีไนโตรเจนเหลว จนกระทั่งเป็นผงละเอียดแล้วเติมบัฟเฟอร์ RLT 450 ไมโครลิตรทันที จากนั้นจึงดูใส่ในคอลัมน์ QIAshredder spin column (lilac) นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 g เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสในหลอด microcentrifuge tube ซึ่งจะมีปริมาตรประมาณ 450 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 0.5 ปริมาตรของเอทานอล (ประมาณ 225 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต ดูดสารละลาย (ประมาณ 650 ไมโครลิตร) ใส่ในคอลัมน์ RNeasy mini column นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 g เป็นเวลา 15 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตรในคอลัมน์ชุดเดิม แล้วเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000g เป็นเวลา 15 วินาที จึงเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ย้ายคอลัมน์ RNeasy mini column ใส่ในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000g เป็นเวลา 15 วินาที และเทส่วนใสทิ้ง จากนั้น เติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตรอีกครั้ง นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000g เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อให้เมมเบรนแห้งมากขึ้น ย้ายคอลัมน์ใส่ใน eppendorf ใหม่เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000g เป็นเวลา 1 นาที แล้วชะล้างอาร์เอ็นเอด้วย RNase free water



ประมาณ 40ไมโครลิตร เหยียงที่ความเร็วรอบ 13000g เป็นเวลา 1นาที่ จะได้สารละลายอาร์เอ็นเอทั้งหมด

#### 7.2.2.การทำ Reverse transcriptase polymerase chain reaction

ตรวจสอบการถอดรหัสของยีน *bar* (transcription) โดยการทำให้ RT-PCR ของ RNA ที่สกัดได้จากข้อ 7.2.1 โดยใช้ Access RT-PCR System (Promega) เพื่อตรวจสอบ mRNA ของยีน *bar* ใช้ไพรเมอร์สองชนิดคือ primer *bar* forward 5'-GGTCTGCACCATCGTCAAC-3' และ primer *bar* reverse 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3' ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาจะประกอบด้วยส่วนผสมแสดงดังตารางที่3 และในปฏิกิริยาที่เป็น negative control จะใช้น้ำ deionized แทนการเติมอาร์เอ็นเอต้นแบบ หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 48 °C เป็นเวลา 45 นาที เป็นขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็น cDNAตามด้วย 94°C เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว หลังจากนั้นจึงเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ตามขั้นตอนของ PCR ดังข้อ 7.1

#### ตารางที่1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการทำ RT-PCR ของอาร์เอ็นเอ

Reagent	volume (ul)	final concentration
Nuclease-Free	5.5	
AMV/Tfl 5X Reaction Buffer	5	1X
dNTP Mix (10mM each dNTP)	0.5	0.2mM
25mM MgSO <sub>4</sub>	1	1mM
AMV Reverse Transcriptase (5u/ul)	0.5	0.1U/ul
Tfl DNA Polymerase (5u/ul)	0.5	0.1U/ul
<i>bar</i> forward primer	5	1uM
<i>bar</i> reverse primer	5	1uM
RNA template	2	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup> copies
ปริมาตรรวม	25	