บทที่ 2
วิธีการวิจัย

วิธีดำเนินการ

1. การศึกษาความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรตาลโตนดโดยพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

บันทึกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาในแต่ละกลุ่มประชากรของตาลโตนด โดยพิจารณาจากลักษณะดังต่อไปนี้

- ลักษณะต้นและใบ
- สีผล
- ขนาดและรูปร่างของผล
- ลักษณะเมล็ด
- ลักษณะช่อดอก

2. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรตาลโตนดโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

2.1 การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้สารละลาย CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) โดยใช้ตัวอย่างใบตาลโตนดประมาณ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1.5 X 1.5 เซนติเมตร บดละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง ใส่ในหลอดเอฟเพนดอร์ฟขนาด 2 มิลลิลิตร เติม CTAB buffer (hexadecyltrimethyammonium bromide) ซึ่งประกอบ ด้วย PVP-40 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, NaCl เข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, CTAB เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอน ดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลแช่เย็นความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 50

ไมโครลิตร [Tris-HCl (pH 7.5) 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA (pH 7.0) 1 มิลลิโมลาร์] ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอกาโรส (Promega, USA) ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ใน TAE buffer (Tris Base, Glacial acetic acid, Na_2EDTA 0.5 M pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA) ย้อมสีแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation

2.2 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรตาลโตนด โดยเทคนิค RAPD

คัดเลือกไพรเมอร์ RAPD ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 200 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มได้ด้วยปฏิกิริยา PCR และให้ความแตกต่างระหว่างตัวแทนของกลุ่มประชากรตาลโตนด โดยจากการเก็บตัวอย่างและสอบถามบุคคลในพื้นที่ พบว่ามีการจำแนกตาลโตนดเป็น 3 พันธุ์คือ พันธุ์ข้าว พันธุ์กา และพันธุ์ขมิ้น จากลักษณะสีผิวผล ดังนั้นในเบื้องต้นจึงเลือกใช้ตาลโตนด 3 พันธุ์ดังกล่าวอย่างละต้น และต้นเพศผู้ที่คาดว่าเป็นพันธุ์ข้าวและพันธุ์ขมิ้น โดยสังเกตจากพันธุ์ที่อยู่ใกล้เคียงอย่างละต้น รวม 6 ต้น เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มประชากรในการคัดเลือกไพรเมอร์

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอจากจีโนมของตาลโตนดซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ 60 นาโนกรัม 10x *Taq* buffer (Promega, USA) 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTP เข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ *Taq* polymerase เข้มข้น 1.0 ยูนิตต่อปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycler) โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 39 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ในรอบสุดท้าย หลังการทำ PCR นำสารละลายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้น อกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer (Tris Base, Boric acid, Na_2EDTA 0.5 M pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 50 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ล้างน้ำนาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต 260 นาโนเมตร และถ่ายรูปโดยใช้ Gel documentation คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณและให้แถบ ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวแทนของแต่ละกลุ่มประชากร

นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้แล้วมาทำการคัดเลือกอีกครั้ง โดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่มประชากรเป็น 6 ตัวอย่าง แล้วนำไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างอย่างชัดเจนและแถบดีเอ็นเอที่คมชัด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของประชากรที่สุ่มเก็บมาทั้งหมด จำนวน 116 ตัวอย่าง เพื่อนำรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรต่อไป

2.3 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรตาลโตนดโดยเทคนิค ISSR

ทดสอบหาสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด สำหรับเทคนิค ISSR (ตารางที่ 1) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้งหมดด้วยปฏิกิริยา PCR ตามสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 60 นาโนกรัม 10x *Taq* buffer (Biolab, USA) 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ dNTP เข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ *Taq* polymerase เข้มข้น 1.0 ยูนิตต่อปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ P1 มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 27 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที ในรอบสุดท้าย

ไพรเมอร์ P2 มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 27 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที ในรอบสุดท้าย

ไพรเมอร์ P3 มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 27 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที ในรอบสุดท้าย

ไพรเมอร์ P4 มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 27 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที ในรอบสุดท้าย

ไพรเมอร์ P6 และ P8 มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ในรอบสุดท้าย

ตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้โดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และถ่ายรูปโดยใช้ Gel documentation

2.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

แปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอเป็นข้อมูลแบบ binary โดยให้ตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1 และตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเท่ากับ 0 คำนวณความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอออกมาในรูป Similarity Index และสร้างเดนโดรแกรมจากการวิเคราะห์แบบ Cluster Analysis โดยวิธี UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS for Windows Version 11.0 ตามวิธีการของ Jaccard (1908) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่มประชากร

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด สำหรับเทคนิค ISSR

Primer		Sequences (5' --> 3')
P1	$(AGG)_6$	AGGAGGAGGAGGAGGAGG
P2	$(AG)_{10}G$	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGG

P3	$(CT)_{10}G$	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
P4	$(AG)_{10}T$	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGT
P6	$(AC)_{8}CTT$	ACACACACACACACACCTT
P8	$(GGGTG)_{3}$	GGGTGGGGTGGGGTG

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

ใบตาลโตนดจากแหล่งปลูกในเขตอำเภอสิงหนคร อำเภอสทิงพระ อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา และอำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากต้นที่เกษตรกรมีการเก็บน้ำหวาน หรือเก็บผลมาใช้ประโยชน์ แยกกลุ่มตามพันธุ์ และแยกต้นเพศผู้ ต้นเพศเมีย จำนวนทั้งสิ้น 116 ตัวอย่าง ดังรายละเอียด ในตารางที่ 2

2. สารเคมี

- CTAB (Hexadecyl Trimethyl - Ammonium Bromide)
- □ - Mercaptoethanol
- PVP - 40 (Polyvinyl pyrolidone)
- NaCl (Sodium Chloride)
- Na_2EDTA (Sodium Ethylene Diamine Tetra Acetate)
- Tris-HCl (Tris-Hydrochloride)
- Chloroform
- Isopropanol
- TE buffer
- Ethanol
- Agarose (Promega, USA)
- Acetic acid

- Boric acid
- Tris base
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- 100 bp และ 500 bp DNA Ladder (Operon, USA)
- λ DNA (Promega, USA)
- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- $MgCl_2$ (Promega, USA)
- 10x *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA)
- Primer

- RAPD Primer จำนวน 200 ชนิด ได้แก่ OPA01-20, OPB01-20, OPC01-20, OPD01-20, OPT01-20, OPR01-20, OPAA01-20, OPAB01-20, OPZ01-20, OPE-11, OPE-14, OPF08, OPJ-09, OPJ-16, OPK-02, OPO-08, OPP-08, OPQ-14, OPU-08, OPX-11, OPX-18, OPAI-21, OPAL-20, BC210, UBC35A, IBRC-RP07, No.8, No.11 และ W-11
- ISSR Primer จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P6 และ P8

3. อุปกรณ์

- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซ็นตริฟิวจ์
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- แท่งแม่เหล็ก
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า
- หม้อนึ่งความดันไอ
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส

- เครื่องพีซีอาร์
- เครื่องบดตัวอย่าง
- หลอดเอฟเพนดอร์ฟ
- ไมโครเวฟ
- Gel ducumentation
- น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง
- เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดต่าง ๆ

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างและแหล่งพันธุกรรมของประชากรตาลโตนดพันธุ์กา พันธุ์ข้าว พันธุ์ขมิ้น พันธุ์หม้อ พันธุ์ไข่ และกลุ่มต้นเพศผู้ที่ไม่สามารถระบุพันธุ์ได้

เพศ	พันธุ์	แหล่งพันธุกรรม			จำนวน	รหัส**
		จังหวัด	อำเภอ	ตำบล		
เมีย	กา	สงขลา	สิงหนคร	ชิงโค	2	BF001-002*
(F)	(B)		สทิงพระ	คูขุด	6	BF101-106
				ท่าหิน	3	BF601-603
			สิงหนคร	ชิงโค	6	BF201-206
			ระโนด	ระโนด	9	BF301-309
	ข้าว		สทิงพระ	คูขุด	1	WF001*
	(W)				6	WF101-106
				ดีหลวง	3	WF401-403
				ท่าหิน	3	WF601-603
			สิงหนคร	ชิงโค	10	WF201-210
			ระโนด	ระโนด	11	WF301-311
	ขมิ้น		สทิงพระ	คูขุด	1	YF001*
	(Y)				1	YF101
				ดีหลวง	1	YF401

				ท่าหิน	6	YF601-606
	ไข่ (E)	เพชรบุรี	บ้านลาด	ถ้ำรงค์	8	EF501-508
	หม้อ (P)	เพชรบุรี	บ้านลาด	ถ้ำรงค์	2	PF501-502
ผู้	ไม่สามารถ	สงขลา	สทิงพระ	คูขุด	1	WM001*
(M)	ระบุพันธุ์ได้				1	YM001*
					6	MM101-106
				ดีหลวง	1	WM401
			สิงหนคร	ชิงโค	9	MM201-209
			ระโนด	ระโนด	14	MM301-314
		เพชรบุรี	บ้านลาด	ถ้ำรงค์	5	EM501-505
		รวม			116	

หมายเหตุ * ต้นที่ใช้ในการทดสอบเบื้องต้นกับไพรเมอร์จำนวน 200 ไพรเมอร์

****รหัส**

อักษรตำแหน่งแรก	หมายถึง	ชื่อพันธุ์
B	คือ	พันธุ์กา
W	คือ	พันธุ์ข้าว
Y	คือ	พันธุ์ขมิ้น
E	คือ	พันธุ์ไข่
P	คือ	พันธุ์หม้อ
M	คือ	ไม่สามารถระบุพันธุ์ได้
อักษรตำแหน่งที่สอง	หมายถึง	เพศ
F	คือ	ต้นเพศเมีย
M	คือ	ต้นเพศผู้
อักษรตำแหน่งที่สาม	หมายถึง	สถานที่เก็บตัวอย่าง

1	คือ	ตำบลคูขุด	อำเภอสทิงพระ	จังหวัดสงขลา
2	คือ	ตำบลชิงโค	อำเภอสิงหนคร	จังหวัดสงขลา
3	คือ	ตำบลระโนด	อำเภอระโนด	จังหวัดสงขลา
4	คือ	ตำบลดีหลวง	อำเภอสทิงพระ	จังหวัดสงขลา
5	คือ	ตำบลถ้ำรงค์	อำเภอบ้านลาด	จังหวัดเพชรบุรี
6	คือ	ตำบลท่าหิน	อำเภอสทิงพระ	จังหวัดสงขลา