บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

1.วัสดุพืช

วัสดุพืชที่ใช้ในการศึกษาจำนวนหนอนและสกัดดีเอ็นเอ

ต้นลองกอง ลางสาด และดูกู จากสวนของเกษตรกรอำเภอระแงะ จังหวัดนราธิวาส และอำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี ชนิดละ 5 ต้น และในการสกัดดีเอ็นเอใช้ใบจากต้นที่ทำการสุ่มตัวอย่างหนอนกินใต้เปลือกทุกต้นจากทั้ง 2 สวน

2.วัสดุสารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide)
- β-mercapthoethanol
- PVP-40 (Polyvinyl pyrrolidone)
- NaCl
- Na_2EDTA (Disodium ethylene diaminetetraacetate)
- Tris-HCl pH 8.0
- Chloroform
- Isopropanol
- Ethanol
- Liquid nitrogen

2.2 สารเคมีสำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซีส

- Nusieve 3 : 1 agarose (FMC Bioproduct, U.S.A.)
- SeaKem agarose (FMC Bioproduct, U.S.A.)
- Glacial acetic acid
- Boric acid
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- 100 bp และ 500 bp DNA Ladder (Operon, U.S.A.)

- Na_2EDTA
- Lamda DNA (λ DNA)
- Tris-base

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (PCR)

- dNTP (dCTP, dATP, dGTP และ dTTP) (Promega, U.S.A.)
- ไพรเมอร์ จำนวน 120 ชนิด (OPA-01-20, OPB-01-20, OPC-01-20, OPD-01-20, OPT-01-20 และ OPR-01-20) (Operon, U.S.A.)
- $MgCl_2$
- Taq DNA Polymerase B (Promega, U.S.A.)
- 10 X Taq buffer (Promega, U.S.A.)
- ddH_2O

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาและสุ่มเก็บตัวอย่างหนอน (รณกร โชชัยพันธวงค์, 2540)

1.1 ควอแดรทขนาด 4x4 และ 2x8 ตารางนิ้ว
1.2 ตารางนับพื้นที่แผล ขนาด 32 ช่อง (0.5x0.5 ตารางนิ้ว)
1.3 ปากคีบ ป้ายพลาสติก เครื่องนับ กล่องโฟมและไหมพรม
1.4 ลวด ป้ายอะลูมิเนียม และปากกาเขียนเครื่องแก้ว

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเลคโตรโฟรีซีส และการทำ RAPD

2.1 ตู้เย็น
2.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง
2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
2.5 เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติและแท่งแม่เหล็ก
2.6 เครื่องวัดสารละลายอัตโนมัติปรับปริมาตรได้ 2.5, 20, 50, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
2.7 หม้อนึ่งไฟฟ้าอัตโนมัติ
2.8 เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีสชนิดแนวนอน
2.9 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
2.10 ไมโครเวฟ

2.11 เครื่องพีซีอาร์

2.12 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงอุณหภูมิต่ำ

2.13 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)

2.14 เครื่องกระแสวน (vortex)

2.15 ยูวีทรานสิลูมิเนเตอร์ (UV Transilluminater)

2.16 ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส

3. อุปกรณ์อื่น ๆ

3.1 เครื่องแก้ว ประกอบด้วย บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปตต์ และขวด

3.2 โกร่งสำหรับบดตัวอย่างพืช

3.3 น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง

3.4 หลอดแอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf)

3.5 ปิเปตต์ทิป (Pipette tips)

3.6 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

วิธีการ

1. เปรียบเทียบการต้านทานต่อการทำลายของหนอนกินใต้เปลือก ในลองกอง ลางสาด และดูกู

ศึกษาจำนวนของหนอนกินใต้เปลือก 4 ชนิดบริเวณผิวเปลือกในลองกอง ลางสาด และดูกู และเปรียบเทียบการทำลายของหนอนกินใต้เปลือก โดยเลือกสวนของเกษตรกรที่ปลูกลองกอง ลางสาด และดูกูปะปนกันในสวนเดียวกันเพื่อใช้ในการศึกษาการทำลายของตัวหนอน ทำการศึกษาจาก 2 สวน คือ สวนเกษตรกรอำเภอระแงะ จังหวัดนราธิวาส และสภาพโดยทั่วไปของสวนจังหวัดนราธิวาสคือไม่ค่อยมีพืชแซมร่มเงา (ภาพที่ 5 ข) จึงมีแสงแดดส่องถึงพืชปลูกที่เจริญเติบโตภายในสวนค่อนข้างมาก และการปฏิบัติดูแลรักษามีน้อย ส่วนสวนที่อำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี ภายในสวนมีพืชแซมร่มเงา (ภาพที่ 5 ก) และการปฏิบัติดูแลรักษามากกว่าสวนจังหวัดนราธิวาส ต้นพืชในทั้ง 2 สวนมีอาการซึ่งเกิดจากการทำลายของหนอนกินใต้เปลือกบริเวณลำต้นโดยเปลือกมีรอยตะปุ่มตะป่ำ (ภาพที่ 6 ค) และปลายกิ่งแห้งตาย (ภาพที่ 6 ง) ทำการสุ่มต้นลองกอง ลางสาด และ ดูกู ที่จะใช้ในการศึกษา ชนิดละ 5 ต้น และทำการบันทึกข้อมูลต่อไปนี้

1.1 นับจำนวนตัวหนอนแต่ละชนิดโดยใช้ควอแดรทตามวิธีการของรณกร โชชัยพันธวงค์ (2540) ใช้ควอแดรทขนาด 4x4 ตารางนิ้ว (ภาพที่ 6 ก) สุ่มนับจำนวนหนอนจากเปลือกต้นจำนวน 4 จุด และควอแดรทขนาด 2x8 ตารางนิ้ว (ภาพที่ 6 ข) สุ่มนับจำนวนหนอนจากเปลือกกิ่ง 4 กิ่งต่อต้น สุ่มนับจำนวน 4 จุดต่อกิ่ง โดยทาบบริเวณต้นและกิ่งของลองกอง ลางสาด และดูกู สูงจาก

โคนต้น 1.5 เมตร และจากโคนกิ่ง 1.5 เมตร เช่นกัน ใช้ปากคีบแกะเปลือกที่เป็นแผลซึ่งเกิดจากการทำลายของหนอนกินใต้เปลือก นับจำนวนหนอน หลังจากนับเสร็จใส่ตัวหนอนกลับที่เดิม บันทึกข้อมูลเดือนละ 1 ครั้ง จำนวน 12 ครั้ง ระหว่างเดือนมิถุนายน 2542 - มิถุนายน 2543 (ยกเว้นเดือนธันวาคม 2542 ที่ไม่มีการบันทึกข้อมูล เนื่องจากเกิดภาวะน้ำท่วม)

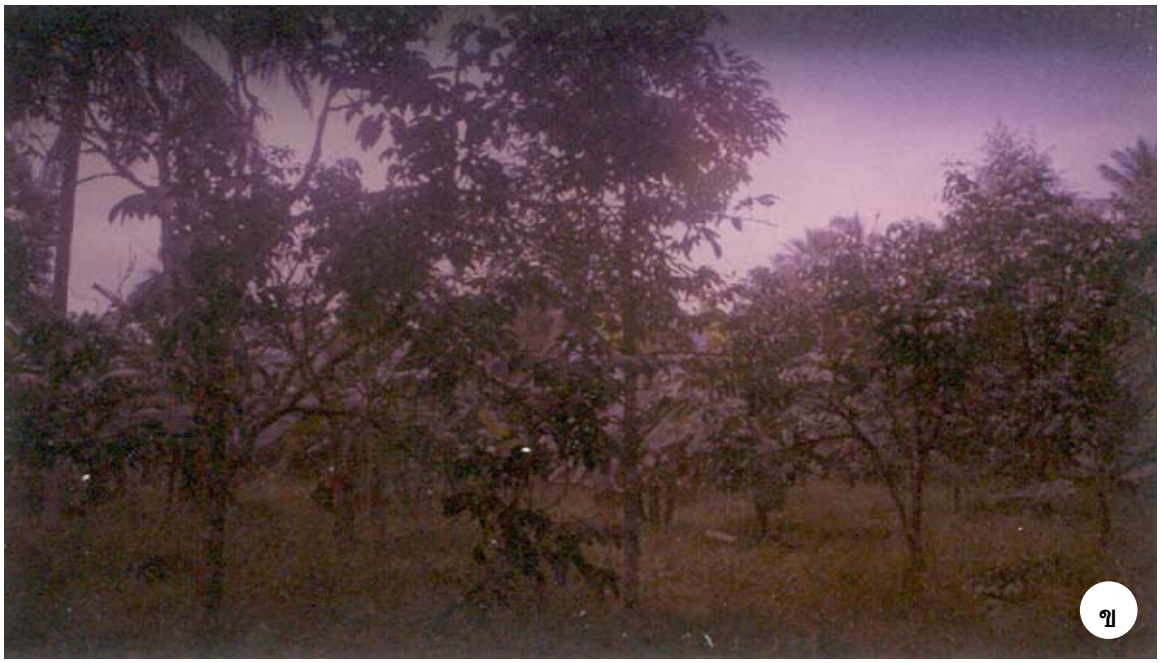
1.2 ศึกษาการทำลายของหนอนกินใต้เปลือก ประเมินความเสียหายของพืชที่เกิดจากการทำลายของตัวหนอน (ตารางนิ้วต่อต้นต่อเดือน) โดยดูจากพื้นที่แผลในสภาพรวมของแต่ละต้น (ต้นเดียวกับที่ทำการสุ่มนับจำนวนหนอน) ใช้ควอแดรทขนาด 4x4 ตารางนิ้วซึ่งมีตารางขนาด 0.5x0.5 ตารางนิ้ว (32 ช่อง/ตาราง) สำหรับต้น และใช้ควอแดรทขนาด 2x8 ตารางนิ้วซึ่งมีตารางขนาด 0.5x0.5 ตารางนิ้ว (32 ช่อง/ตาราง) สำหรับกิ่ง ทาบบริเวณแต่ละจุด โดยสุ่มบริเวณลำต้น 4 จุด และสุ่มบริเวณกิ่งจำนวน 4 กิ่ง สุ่ม 4 จุดต่อกิ่งต่อต้น บันทึกข้อมูลจำนวน 3 ครั้ง คือวันที่ 8 สิงหาคม 2542 12 กุมภาพันธ์ 2543 และ 10 มิถุนายน 2543

1.3 บันทึกจำนวนหนอนกินใต้เปลือกในช่วงเวลาต่างๆ ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2542 -มิถุนายน 2543

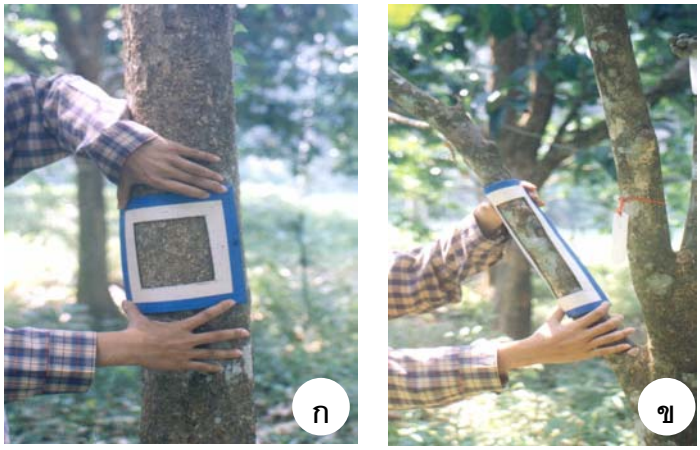
1.4 ประเมินระดับความเสียหายของพืชจากการทำลายของตัวหนอนในแต่ละต้นที่ทำการนับจำนวนหนอน โดยการนับจำนวนกิ่งเล็กและกิ่งใหญ่ที่มีรอยแผลจากการทำลายของหนอนกินใต้เปลือก คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกิ่งทั้งหมดภายในต้นนั้น ๆ โดยกิ่งใหญ่หมายถึงทุกกิ่งที่แตกแขนงออกจากลำต้น และกิ่งเล็กหมายถึงทุกกิ่งที่แตกแขนงออกจากกิ่งใหญ่ บันทึกข้อมูลจำนวน 3 ครั้ง คือวันที่ 8 สิงหาคม 2542 12 กุมภาพันธ์ 2543 และ 10 มิถุนายน 2543

1.5 นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) หากตัวเลขที่เก็บมาไม่คงที่ จำเป็นต้องมีการแปลงข้อมูล (transformation) (Gomez and Gomez, 1984)

1.6 บันทึกปริมาณน้ำฝนและความชื้นของแต่ละจังหวัดที่ศึกษาการทำลายของหนอนกินใต้เปลือก (ภาพผนวกที่ 1 และ 2)



ภาพที่ 5 สภาพทั่ว ๆ ไปของสวนเกษตรกร อำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี (ก) และสวนเกษตรกร อำเภอระแงะ จังหวัดนราธิวาส (ข)



ภาพที่ 6 วิธีการสุ่มนับจำนวนหนอนกินใต้เปลือกบริเวณลำต้นโดยใช้ควอแดรทขนาด 4x4 ตารางนิ้ว (ก) และบริเวณกิ่ง โดยใช้ควอแดรทขนาด 2x8 ตารางนิ้ว (ข) และอาการซึ่งเกิดจากการทำลายของหนอนกินใต้เปลือกบริเวณลำต้น โดยเปลือกมีรอยตะปุ่มตะป่ำ (ค) และปลายกิ่งแห้งตาย (ง) (ลูกศรชี้)

2. ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของ ลองกอง ลางสาด และดูกู โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลคือ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) โดยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบ

สกัดดีเอ็นเอเพื่อนำดีเอ็นเอของต้นที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างหนอนมาตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู ในแต่ละสวนที่ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค RAPD โดยสุ่มตัวอย่างใบลองกอง ลางสาด และดูกูจากสวนที่ทำการศึกษาจากข้อ 1 เลือกใบเพสลาด อายุใบประมาณ 3-4 สัปดาห์หลังจากแตกใบใหม่ มาสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB บัฟเฟอร์ ตามวิธีที่ประยุกต์จาก Doyle and Doyle (1990) โดยใช้ตัวอย่างพืชประมาณ 0.2 กรัมน้ำหนักสด ต่อสารสกัดดีเอ็นเอ 1 มิลลิลิตร ทำการบดตัวอย่างพืชในโกร่งที่แช่แข็งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว จนตัวอย่างพืชละเอียด เทใส่หลอดแอพเพนดอร์ฟ เติม CTAB บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม mercapthoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องกระแสวน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติม Chloroform 700 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน โดยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดแอพเพนดอร์ฟ ที่สะอาด เติม Isopropanol 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำโดยกลับหลอดไปมา จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน โดยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE บัฟเฟอร์ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกมาใช้

2.2 วิธีการเตรียมเจล เพื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

เตรียมเจลโดยใช้เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส ใช้ตัวกลางเป็นอะกาโรส (SeaKem LE) เข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ นำสารสกัดดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตรมาใส่ในหลุมของเจล ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอในสารละลายอิเลคโตรด TAE บัฟเฟอร์ ใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เป็นเวลา 30 นาที

2.3 วิธีการย้อมสีแถบดีเอ็นเอ

นำเจลที่ได้มาทำการย้อมสี เพื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอบนแผ่นเจล สีที่ใช้ย้อม

คือ Ethidium bromide เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การย้อมสีดีเอ็นเอทำในที่มืดทำการย้อมโดยแช่แผ่นเจลในสารละลายที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำดีไอออไนซ์ (deionized) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเจลไปตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ เป็นการประมาณค่าโดยเทียบความหนาของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA) ที่ทราบปริมาณแน่นอน

2.4 การทำพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างสุ่ม โดยเทคนิค RAPD ทดสอบไพรเมอร์และทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมมาทดสอบ ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้ความเข้มข้นของสารต่างๆ ดังนี้

- ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	1	ไมโครลิตร
- บัฟเฟอร์ (10 X Taq buffer)	2	ไมโครลิตร
- $MgCl_2$	1.5	ไมโครลิตร
- dNTP เข้มข้นชนิดละ 100 mM	2	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์	1.5	ไมโครลิตร
- Taq DNA Polymerase B	0.3	ไมโครลิตร
- น้ำดีไอออไนซ์ (ddH_2O)	16.2	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันดี นำไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิ และเวลาดังนี้ (Drenth, 1998)

95 องศาเซลเซียส 1 นาที
37 องศาเซลเซียส 1 นาที
72 องศาเซลเซียส 2 นาที
} ทำซ้ำจำนวน 39 รอบ

95 องศาเซลเซียส 1 นาที
37 องศาเซลเซียส 1 นาที
72 องศาเซลเซียส 10 นาที
} จำนวน 1 รอบ

2.5 การเตรียมเจลสำหรับดูผลผลิตพีซีอาร์

เตรียมเจลโดยใช้เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส ใช้ตัวกลางเป็นอะกาโรส (Nusive 3 : 1 agorose) เข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน TBE บัฟเฟอร์ แล้วจึงนำสารละลายจากผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาใส่หลุมของเจล ในสารละลาย TBE บัฟเฟอร์ โดยใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วจึงนำไปย้อมสีตามวิธีการเดียวกับข้อ 2.3 โดยนำเจลที่ได้มาทำการย้อมสี นำแผ่นเจลไปดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอ

เลตเพื่อดูความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder ขนาด 100 และ 500 คู่เบส) แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ผล

2.6 การคัดเลือกไพรเมอร์

ทำการทดสอบไพรเมอร์ จำนวน 120 ชนิด คือ OPA-01-20, OPB-01-20, OPC-01-20, OPD-01-20, OPT-01-20 และ OPR-01-20 คัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพืชทั้ง 3 ชนิดชัดเจน มาทดสอบเพื่อศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ วิเคราะห์ผลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นภายในพืชชนิดเดียวกัน และระหว่างพืชแต่ละชนิดคือลองกอง ลางสาด และดูกู ทั้งภายในสวนเดียวกัน และระหว่างสวน