บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วิธีดำเนินการ

1. การศึกษาความแตกต่างระหว่างพืชสกุล *Parkia* ทง และเตียน รวมทั้งภายในกลุ่มสะตอ (*Parkia speciosa* Hassk.) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการเก็บตัวอย่างสะตอ และพืชสกุล *Parkia* จากแหล่งปลูกต่างๆ (ตารางที่ 3) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบอ่อน แยกต้น กลุ่ม และชนิด ของพืชสกุล *Parkia* ต้นที่เก็บตัวอย่าง ทำการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังต่อไปนี้

- ลักษณะต้นและใบ
- ลักษณะดอก และช่อดอก
- ลักษณะฝัก และขนาดฝัก
- ลักษณะเมล็ด และขนาดเมล็ด

2. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างพืชสกุล *Parkia* ทง และเตียน รวมทั้งภายในกลุ่มสะตอ (*Parkia speciosa* Hassk.) โดยเทคนิคอาร์เอพีดี

2.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแหล่งเชื้อพันธุ์สะตอ และพืชสกุล *Parkia* อีก 3 ชนิด รวมทั้งทง และเตียน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบ (ใบเพสลาด) ของสะตอ (สะตอข้าว และสะตอดาน) จำนวน 69 ต้น เหรียง จำนวน 12 ต้น ค้อนก้อง จำนวน 5 ต้น ลูกดิ่ง จำนวน 12 ต้น ทง จำนวน 4 ต้น และเตียน จำนวน 1 ต้น จากสถานที่ต่างๆ (ตารางที่ 3) โดยเก็บตัวอย่างใบประมาณ 1 – 2 ใบต่อต้น ใส่ถุงเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างของพืชสกุล *Parkia* ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

ชนิด/สถานที่	จำนวน (ต้น)
สะตอ (St)	
สะตอข้าว (Kh)	
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง (Kht)	11
สวนเกษตรกรในเขต จ. สงขลา (Khs)	13
สวนเกษตรกรในเขต จ. สุราษฎร์ธานี (Khsu)	12
สะตอดาน (Da)	
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง (Dat)	12
สวนเกษตรกรในเขต จ. สงขลา (Das)	14
สวนเกษตรกรในเขต จ. สุราษฎร์ธานี (Dasu)	7
เหรียง (Ri)	
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	2
สวนเกษตรกรในเขต จ. สงขลา	5
สวนเกษตรกรในเขต จ. สุราษฎร์ธานี	5
ลูกดิ่ง (Ld)	
ศูนย์วิจัยพืชสวน จ. ตรัง	5
สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช จ. นครราชสีมา	7
ค้อนก้อง (Kg)	
ศูนย์วิจัยพืชสวน จ. ตรัง	4
สวนเกษตรกรในเขต จ. เลย	1
เตียน (Ti)	
สวนเกษตรกรในเขต จ. สุราษฎร์ธานี	1
ทง (Tg)	
สวนเกษตรกรในเขต จ. พัทลุง	1
ศูนย์วิจัยพืชสวน จ. ตรัง	3
รวม	**103**

2.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชสกุล *Parkia* ที่สุ่มเก็บ โดยใช้สารละลาย CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) ซึ่งดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) ใช้ตัวอย่างใบพืชสกุล *Parkia* ประมาณ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสด บดใน CTAB บัฟเฟอร์ (PVP – 40, NaCl, EDTA 0.5 M pH 8.0, CTAB 2%) ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2% ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในโกร่งให้ละเอียด จากนั้นใส่ในหลอดแอฟเพนดอร์ฟ เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายที่แยกชั้นใสส่วนบน ดูดสารละลายเฉพาะส่วนใสใส่หลอดแอฟเพนดอร์ฟใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ หรือวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล ความเข้มข้น 70% ที่ผ่านการแช่เย็น จำนวน 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ 70 ไมโครลิตร [Tris – HCl (pH 7.5) 10 mM และ Na_2EDTA (pH 7.0) 1 mM] ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.2 วิธีการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ ดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรส (LE Agarose; Promega, USA) เข้มข้น 0.7% แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 M, pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation

2.3 การคัดเลือกไพรเมอร์

ทำการทดสอบไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 180 ชนิด (OPA01-20, OPB01-20, OPC01-20, OPD01-20, OPT01-20, OPR01-20, OPAA01-20, OPAB01-20 และ OPZ01-20: Operon, USA) คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และทำ

การแยกความแตกต่างระหว่างตัวแทนของกลุ่มประชากรต่างๆ ของพืชสกุล *Parkia* ในเบื้องต้นทำการเก็บตัวอย่างภายในกลุ่มสะตอ คือ กลุ่มสะตอข้าว กลุ่มสะตอดาน และเหรียง อย่างละ 1 ต้น ที่เก็บจากบริเวณเขตจังหวัดสงขลา มาเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มประชากรในการคัดเลือกไพรเมอร์แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต 10X *Taq* บัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTP เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ตั้งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ อุณหภูมิที่ใช้เริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 37 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 41 รอบ และรอบสุดท้ายตามด้วย 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที หลังทำพีซีอาร์ นำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว จำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้น LE อะกาโรส ที่มีความเข้มข้น 1.5% ละลายใน TBE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Boric acid, Na_2EDTA 0.5 M; pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ 60 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำ 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณและให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวแทนประชากรแต่ละพันธุ์ และแต่ละชนิด

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของประชากรทั้งหมด คัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างประชากรทั้งหมด ศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ วิเคราะห์ผล แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพืชสกุล *Parkia* แต่ละชนิด ทง และเตียน รวมทั้งภายในกลุ่มสะตอ (สะตอข้าว และสะตอดาน)

3. การศึกษาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพืชสกุล *Parkia* ทง และเตียน รวมทั้งภายในกลุ่มสะตอ (*Parkia speciosa* Hassk.)

ศึกษาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ระหว่างพืชสกุล *Parkia* ทง และเตียน รวมทั้งภายในกลุ่มสะตอ ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ โดยแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นแบบ Binary คือให้ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ มีค่าเท่ากับ

1 และตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0 เปรียบเทียบ ณ ตำแหน่งเดียวกัน โดยคิดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและเพิ่มปริมาณได้สม่ำเสมอเมื่อมีการทำพีซีอาร์ซ้ำ 2 ครั้ง วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการใช้ UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) cluster analysis หาค่า Similarity coefficient ตามวิธีของ Jaccard (1908) กับโปรแกรม NTSYS pc-2.1 (Rohlf, 2002)

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

ทำการเก็บตัวอย่างใบสะตอ เหรียง ลูกดิ่ง ค้อนก้อง ทง และเตียน จากสถานที่ต่างๆ ดังนี้คือ

- ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง กรมวิชาการเกษตร อ. สิเกา จ. ตรัง
- สวนเกษตรกร อ. ทุ่งตำเสา อ. จะนะ และ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
- สวนเกษตรกร กิ่ง อ. วิภาวดี อ. พุนพิน และ อ. คีรีรัฐนิคม จ. สุราษฎร์ธานี
- สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ. วังน้ำเขียว จ. นครราชสีมา
- สวนเกษตรกร อ. ด่านซ้าย จ. เลย
- สวนเกษตรกร อ. ป่าพะยอม จ. พัทลุง

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- CTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide)
- β-mercaptoethanol
- PVP-40 (Polyvinyl pyrolidone)
- NaCl (Sodium chloride)
- Na_2EDTA (Disodium ethylene diaminetetra acetate)
- Tris – HCI (pH 8.0)
- Chloroform

- Isopropanol
- TE buffer
- Ethanol

2.2 สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

- LE agarose (FMC Bioproduct, USA)
- Glacial acetic acid
- Boric acid
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- Lamda DNA (λ DNA)
- 100 bp และ 1000 bp DNA Ladder (Operon, USA)

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- Primer OPA01-20, OPB01-20, OPC01-20, OPD01-20, OPT01-20, OPR01-20, OPAA01-20, OPAB01-20 และ OPZ01-20 (Operon, USA)
- $MgCl_2$
- 10X *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA)

3. อุปกรณ์

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างใบพืชและฝัก

- ถุงพลาสติก
- กรรไกร
- กล่องโฟม

- เวอร์เนีย
- สายวัด
- ปากกาเขียนเครื่องแก้ว

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส และการทำพีซีอาร์

- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซนติฟิวก์
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- แท่งแม่เหล็ก
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า (vortex)
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส
- เครื่องพีซีอาร์
- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอดเอฟเพนดอร์ฟ
- ตู้ไมโครเวฟ
- Tip
- เครื่อง Gel documentation
- น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง
- เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดต่างๆ