บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พันธุ์ถั่วลันเตาที่ใช้ทดลอง

1.1.1 ถั่วลันเตาสายต้นของลูกผสมระหว่างฝาง 7 × P 309 รุ่น BC_1F_5 (ในที่นี้ใช้เขียนย่อว่า สายต้นฝาง 7 รุ่น BC_1F_5)

1.1.2 ถั่วลันเตาสายต้นของลูกผสมระหว่าง # 3 × P 309 รุ่น BC_3F_2 (ในที่นี้ใช้เขียนย่อว่า สายต้น # 3 รุ่น BC_3F_2)

1.1.3 ถั่วลันเตาสายต้นของลูกผสมระหว่าง # 5 × P309 รุ่น BC_3F_2 (ในที่นี้ใช้เขียนย่อว่า สายต้น # 5 รุ่น BC_3F_2)

1.1.4 พันธุ์หนองอุก

1.1.5 พันธุ์ P 309

1.1.6 พันธุ์ฝาง 7

1.1.7 ถั่วลันเตาพันธุ์ Taichung No.11

1.1.8 ถั่วลันเตาพันธุ์ Taichung No.12

1.1.9 ถั่วลันเตาพันธุ์ Taichung No.13

1.1.10 ถั่วลันเตาพันธุ์ Taichung No.14

1.1.11 ถั่วลันเตาพันธุ์ Taichung No.15

1.1.12 Good farmer No. 2

1.1.13 Native white flower

1.1.14 Nong You Ta Chia No.2

พันธุ์ที่นำมาใช้ได้มาจาก 2 แหล่ง คือมูลนิธิโครงการหลวง และ Taichung District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, ROC. (ตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 พันธุ์และสายต้นของถั่วลันเตา ประวัติ ความต้านทานโรคและแหล่งที่มา

พันธุ์ / สายต้น	ประวัติ	ความต้านทานโรคราแป้ง	แหล่งที่มา
ฝาง 7 รุ่น BC_1F_5	ฝาง 7 × P 309	ต้านทาน/อ่อนแอ*	มูลนิธิโครงการหลวง
# 3 รุ่น BC_3F_2	#3 × P 309	ต้านทาน/อ่อนแอ*	มูลนิธิโครงการหลวง
# 5 รุ่น BC_3F_2	#5 × P 309	ต้านทาน/อ่อนแอ*	มูลนิธิโครงการหลวง
หนองอุก	-	ต้านทาน/อ่อนแอ*	มูลนิธิโครงการหลวง
P309	-	ต้านทาน	มูลนิธิโครงการหลวง
ฝาง 7	-	อ่อนแอ	มูลนิธิโครงการหลวง
Taichung No.11	Odome × melting sugar	อ่อนแอ	TDARES**
Taichung No.12	Taichung No. 11 × manoa sugar	ต้านทาน	TDARES**
Taichung No.13	Sugar snap × Knight	อ่อนแอ	TDARES**
Taichung No.14	Satsuma × Taichung78-203	ต้านทาน	TDARES**
Taichung No.15	80-75 × Black mesh	ต้านทาน	TDARES**
Good Farmer No 2	-	ต้านทาน	TDARES**
Native white flower	-	อ่อนแอ	TDARES**
Nong you ta chia No. 2	-	อ่อนแอ	TDARES**

หมายเหตุ : * เมื่อนำต้นปลูกในแปลงเพื่อทดสอบ พบทั้งต้นที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรค

** Taichung District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, ROC.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

1.2.2 Adjustable automatic pipette และ tip ขนาดต่างๆ

1.2.3 Eppendorf ขนาด 1.5 ml และ PCR tube

1.2.4 เครื่อง PCR (Applied Biosystem ; Gene AMP PCR system)

1.2.5 อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟริซิสชนิดแนวนอน (Mupid®.EXU)

1.2.6 เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอด้วยแสง UV (UV transilluminator, UVP BioDoc-It™ system)

1.2.7 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)

1.2.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectophotometer)

1.2.9 เครื่องเขย่า (shaker)

1.2.10 เครื่องอบเครื่องแก้ว (hot air oven)

1.2.11 ตู้แช่แข็ง (freezer) ได้แก่ตู้แช่ -20 °C และ 4 °C

1.2.12 เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)

1.2.13 เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)

1.2.14 ตู้ไมโครเวฟ (microwave)

1.2.15 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)

1.2.16 ชุดโกร่งบดตัวอย่าง (mortar and pestle)

1.2.17 กล้องดิจิตอล

1.2.18 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ช้อนตักสาร กระดาษทิชชู ถุงพลาสติกใสชนิดทนร้อน ปากคีบ ถุงมือ สำลี เชือก ฉลากสำหรับเขียนรายละเอียด

1.3 สารเคมี

1.3.3 Liquid nitrogen

1.3.2 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

1.3.3 Tris base

1.3.4 Chloroform

1.3.5 Ethyl alcohol (EtOH)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.6 Deoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs)

1.3.7 *Taq* DNA polymerase

1.3.8 Paraffin

1.3.9 Bromophenol blue

1.3.10 Ethidium bromide

1.3.11 Agarose

1.3.12 Isopropanol

1.3.13 Plant DNAzol Reagent (DNAzol® ES)

2. วิธีทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลองดังนี้

1. การประเมินและตรวจสอบโรคราแป้งในถั่วลันเตารุ่นพ่อแม่

1.1 การประเมินการเกิดโรคราแป้งในรุ่นพ่อแม่ที่ปรากฏลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรคราแป้งจากลักษณะปรากฏ

เริ่มเพาะเมล็ดถั่วลันเตาสายต้นฝาง 7 รุ่น BC_1F_5 สายต้น #3 รุ่น BC_3F_2 สายต้น #5 รุ่น BC_3F_2 และพันธุ์หนองอุก โดยปลูกพันธุ์ฝาง 7 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราแป้ง และพันธุ์ P 309 ที่เป็นพันธุ์ต้านทานโรคราแป้ง เพื่อใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบทดสอบการเกิดโรคในวันที่ 23 ธันวาคม 2552 ณ สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่ ซึ่งเป็นสถานีวิจัยที่มีการพัฒนาพันธุ์ถั่วลันเตาและเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคราแป้งมาก่อน โดยเพาะเมล็ด 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์เพื่อให้แต่ละคู่ผสมออกดอกพร้อมกันสามารถใช้ในการผสมได้ เมื่อต้นกล้ามีอายุได้สองสัปดาห์จึงทำการย้ายลงแปลงปลูก โดยให้ระยะห่างระหว่างต้นกล้า 10 ซม. แปลงละสองด้านและวางตาข่ายตรงกลางแปลงปลูกเพื่อช่วยพยุงลำต้นถั่วลันเตาเมื่อถั่วลันเตามีการเจริญในระยะต่อมา ประเมินการเกิดโรคราแป้งของต้นถั่วลันเตาโดยการเปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทานโรค (P 309) และพันธุ์อ่อนแอต่อโรค (ฝาง 7) จากลักษณะปรากฏ (ภาพที่ 1) แล้วคัดเลือกเฉพาะต้นที่ต้านทานโรคเพื่อใช้เป็นต้นต้านทานในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 1 ลักษณะปรากฏการเกิดโรคราแป้งจากการเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ฝาง 7 (พันธุ์อ่อนแอต่อโรค) และพันธุ์ P 309 (พันธุ์ต้านทาน)

1.2 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR ในถั่วลันเตา

สุ่มเก็บตัวอย่างใบของต้นถั่วลันเตาที่มีลักษณะต้านทานโรคและอ่อนแอต่อโรคของแต่ละพันธุ์จากการคัดเลือกจากลักษณะปรากฏ สำหรับวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR เพื่อตรวจสอบยีนต้านทานโรคราแป้งตามวิธีการของ อัญชัญ (2550) ดังนี้

1.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

- นำใบพืชทดลองประมาณ 0.1 กรัมมาบดให้ละเอียดโดยใช้ Plant DNAzol Reagent ปริมาตร 300 µl
- นำตัวอย่างที่บดละเอียดใส่ลงใน Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml) แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที
- เติม chloroform ปริมาตร 300 µl เขย่าให้สารละลายเข้ากัน และนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน ใส่หลอดใหม่
- เติม absolute ethanol ปริมาตร 300 µl พลิกหลอดไปมาเบาๆ ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ตะกอนสีขาวขุ่นปรากฏอยู่ที่ก้นหลอด
- เทสารละลายออกจากหลอด จากนั้นเติมสารละลาย Plant DNAzol-ethanol wash ปริมาตร 300 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 rpm. เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งไปเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอน หลังจากนั้นจึงล้างตะกอนโดยเติม 70% ethanol แล้วนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที หมายเหตุ : Plant DNAzol-ethanol wash (Plant DNAzol reagent ปริมาตร 171.4 µl + absolute ethanol ปริมาตร 128.6 µl)

- เทสารละลายออกจากหลอด จากนั้นเติม 70% ethanol ปริมาตร 300 µl เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไป centrifuge อีกครั้งที่ความเร็ว 5,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายออกจากหลอดแล้วคว่ำหลอดทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- ละลายตะกอนด้วย TE buffer 20-80 µl เขย่าเบาๆแล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอนละลายจนหมด เก็บไว้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.2.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ เพื่อนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่พอเหมาะสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

1.2.3 ไพรเมอร์

ใช้ไพรเมอร์ ScOPD10 : forward 5’ GGTCTACACCTCATCTTGATGA 3’ และ reverse 5’ GGTCTACACCTAAACAGTGTCCGT 3’ ซึ่งรายงานโดย อัญชัญ (2550) ว่าสามารถตรวจสอบยีนต้านทานโรคราแป้งได้ที่ตำแหน่ง 850 bp

1.2.4 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 µl ลงใน Eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ประกอบด้วย 1X reaction buffer, 0.5 mM dNTPs (dATP, dTTP, dGTP และ dCTP), primer 80 ng, *i-Taq*™ DNA polymerase 1 Unit, ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) 8 ng และน้ำกลั่น จากนั้นจึงดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการของ อัญชัญ (2550)

อุณหภูมิ	92 °C	92 °C	42 °C	72 °C	72 °C	4 °C
ระยะเวลา	2 min	30 sec	30 sec	60 sec	5 min	α
จำนวนรอบ	1	I ← 44 รอบ →			I	1

1.2.5 การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซิส โดยดูการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 850 bp ดังนี้

- เตรียม agarose ความเข้มข้น 1 % โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1x TBE buffer แล้วนำไปต้มจน agarose หลอมละลาย
- ทำความสะอาดถาดเจลและหวีเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70% ethanol
- เมื่อ agarose หลอมละลายแล้ว นำไปเทลงในถาดเตรียมเจลที่เตรียมไว้ โดยให้ agarose gel มีความหนาประมาณ 3-5 mm. ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วางหวีเสียบลงที่ปลายข้างหนึ่งของถาด เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ (well) สำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
- เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงหวีเสียบออก แล้ววางถาดเจลลงในอ่าง electorphoresis ให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ
- เท 1x TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ระดับของ TBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1-3 mm.
- ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแล้วค่อยๆหยอดลงในช่องของ agarose gel
- ปิดฝาอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นานประมาณ 25 นาที หรือเมื่อแถบสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ปลายอีกด้านหนึ่งของเจลจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- นำแผ่น agarose gel ไปย้อมด้วย Ethidium bromide จากนั้นตรวจดูลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 ลักษณะทั่วไปของถั่วลันเตารุ่นพ่อแม่

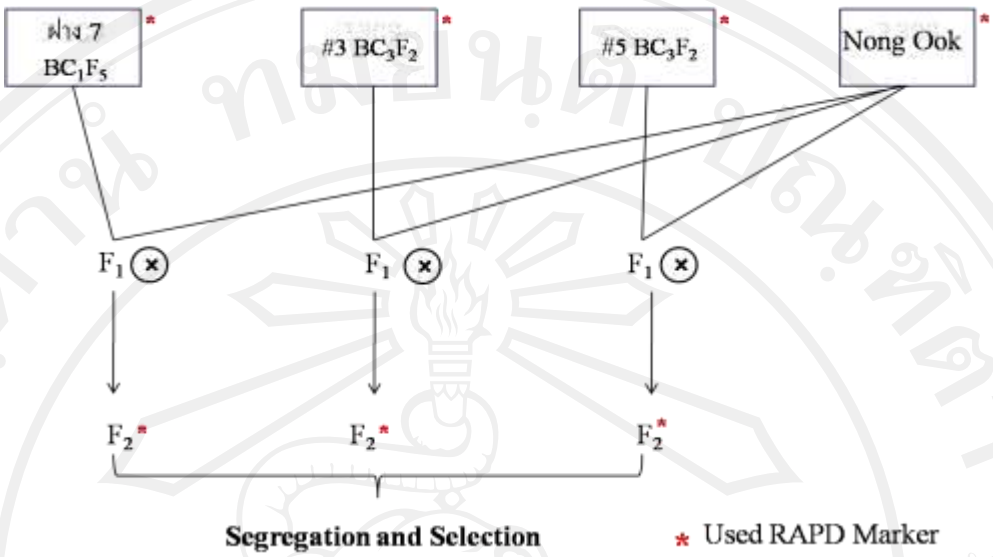
เก็บข้อมูลลักษณะพื้นฐานของแต่ละพันธุ์เช่น ลักษณะความสูง จำนวนข้อลำต้น ความกว้าง-ยาวของฝัก จำนวนฝักต่อต้น ความยาวปล้อง จำนวนเมล็ดต่อฝัก ลักษณะสีบริเวณดอก โคนใบ โคนใบย่อยลักษณะใบ จำนวนดอก และระยะดอกบาน 50%

2. ทดสอบการถ่ายทอดลักษณะการต้านทานโรคราแป้งในลูกผสมรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 2

2.1 การตรวจสอบลักษณะต้านทานโรคราแป้งจากลักษณะปรากฏ

การผสมข้ามระหว่างพันธุ์พ่อและแม่จากต้นที่ให้ลักษณะต้านทานต่อโรคราแป้งที่ได้จากต้นคัดเลือกดังกล่าวข้างต้น ได้แก่พันธุ์ต้านทานโรคราแป้งสายต้นฝาง 7 รุ่น BC_1F_5 สายต้น #3 รุ่น BC_3F_2 และสายต้น #5 รุ่น BC_3F_2 นำมาผสมพันธุ์กับพันธุ์หนองอุกที่ปรากฏลักษณะการต้านทานโรคเช่นกันแบบสลับ (reciprocal cross) (ภาพที่ 2) เตรียมดอกเพศเมียจากดอกที่ยังไม่บานและอับละอองเกสรยังไม่แตกโดยการกำจัดเกสรเพศผู้ออกก่อนการผสมเกสร 1 วัน จากนั้นผสมเกสรในวันต่อมาในช่วงเวลา 6.00 – 9.00 น. เมื่อผสมเกสรเสร็จเรียบร้อยแล้วคลุมดอกที่ถูกผสมด้วยสำลี เขียนชื่อบอกพ่อแม่พันธุ์ และวัน เดือน ปี ที่ผสม เมื่อมีการติดฝักแล้วประมาณ 1 สัปดาห์หลังจากผสมเกสรจึงเอาลำลีออก ปล่อยให้ฝักพัฒนาจนแห้ง แล้วเก็บเมล็ดพันธุ์ลูกผสมของแต่ละคู่ เพาะเมล็ดและปลูกลูกผสมรุ่นที่ 1 ในวันที่ 10 พฤษภาคม 2553 ณ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่ ปล่อยให้แต่ละต้นทุกคู่ผสมในรุ่นนี้ผสมตัวเอง (selfing) เพื่อสร้างลูกผสมรุ่นที่ 2 เก็บเมล็ดแล้วปลูกรุ่นที่ 2 ณ สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่ โดยเพาะเมล็ด เมื่อวันที่ 11 ตุลาคม 2554 และย้ายปลูกลงแปลงเมื่อต้นกล้ามีอายุได้ 2 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในบล็อก (Randomized complete block design; RCBD) 3 ซ้ำๆ ละ 45 หน่วยทดลองในลูกผสมรุ่นที่ 2 และ 14 หน่วยทดลองในพันธุ์เปรียบเทียบ โดยทุกแปลงมีการปลูกพันธุ์ฝาง 7 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไว้ที่หัวแปลงและท้ายแปลงเพื่อใช้เป็นแหล่งเกิดโรคและเกิดการแพร่กระจายสปอร์ของเชื้อโรคราแป้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 แผนภาพคู่ผสมถั่วลันเตาที่ใช้ในการสร้างลูกผสมที่ต้านทานโรคราแป้ง

2.2 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR ในลูกผสมรุ่นที่ 2

สุ่มเก็บตัวอย่างใบของต้นถั่วลันเตาจากแต่ละคู่ผสมเพื่อตรวจสอบยีนต้านทานโรคราแป้งโดยเทคนิค SCAR เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลตามวิธีการของ อัญชัญ (2550)

3. เปรียบเทียบลักษณะที่ดีทางพืชสวน

ตรวจสอบการกระจายตัวของลักษณะการต้านทานโรคราแป้ง ลักษณะความสูง การเกิดลักษณะใบแบบ Afila และสีดอก โดยการนับสัดส่วนแต่ละลักษณะที่เกิดขึ้น

เปรียบเทียบลักษณะความสูงกับความยาวปล้อง ข้อแรกของลำต้นที่ออกดอกและจำนวนข้อลำต้นทั้งหมด โดยการวัดและนับเปรียบเทียบระหว่างถั่วลันเตาต้นสูงและต้นเตี้ย

เปรียบเทียบลักษณะใบต่อการให้ผลผลิตในทุกคู่ผสม

เปรียบเทียบการให้ผลผลิตระหว่างรุ่นพ่อแม่และลูกผสมรุ่นที่ 2 โดยการวัดความยาว ความกว้างของฝัก จำนวนฝัก น้ำหนักต่อฝัก และน้ำหนักฝักต่อต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การตรวจสอบยีนต้านทานโรคราแป้งในถั่วลันเตาโดยเทคนิค RAPD

4.1 พันธุ์ถั่วลันเตาทดลอง

การทดลองนี้ได้ใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตา 8 สายพันธุ์จาก Taichung District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, ROC. ประกอบด้วยพันธุ์ Taichung number 11, 12, 13, 14, 15, Good Farmer No 2, Native white flower และ Nong you ta chia ซึ่งมีอยู่ 4 สายพันธุ์ที่รายงานว่าสามารถต้านทานโรคราแป้งได้คือพันธุ์ Taichung 12, 14, 15 และ Good Farmer's seed

4.2 การเตรียมดีเอ็นเอ

- นำใบพืชทดลองประมาณ 1 กรัมมาบดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว
- นำตัวอย่างที่บดละเอียดใส่ลงใน Eppendorf ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม CTAB extraction buffer ที่อุ่นด้วยอุณหภูมิ 60 °C พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆแล้วนำไปบ่ม ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง พลิกหลอดกลับไปมาทุก 5 นาที เมื่อครบ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำหลอดออกจาก water bath แล้วทิ้งให้เย็น
- เติม chloroform – isolamyl (24 :1) ปริมาตร 1 เท่ากับตัวอย่าง เขย่าอย่างแรงด้วย vortex ก่อนนำไปปั่นหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่
- เติม isopropanal ปริมาตร 1 เท่ากับตัวอย่าง พลิกหลอดไปมาเบาๆ ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ -4 °C เป็นเวลา 30 นาที
- นำมา centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งไปเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอน หลังจากนั้นจึงล้างตะกอนโดยเติม 70% ethanol แล้วนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วคว่ำหลอดทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- ละลายตะกอนด้วย TE buffer 50 µl เขย่าเบาๆแล้วทิ้งไว้ให้ตะกอนละลายจนหมด เก็บไว้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ เพื่อนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่พอเหมาะสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

4.4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ

ใช้ arbitrary primer ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 35 ไพรเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลำดับและรายชื่อของนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ลำดับ	รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' ⟶ 3'
1.	OPAI-11	ACGGCGATGA
2.	OPV-05	TCCGAGAGGG
3.	OPV-10	GGACCTGCTG
4.	OPG-11	TGCCCGTCGT
5.	OPV-19	GGGTGTGCAG
6.	OPV-12	ACCCCCCACT
7.	OPM-07	CCGTGACTCA
8.	OPT-05	GGGTTTGGCA
9.	OPT-07	GGCAGGCTGT
10.	OPAB-4	GGCACGCGTT
11.	OPAB-7	ACGGCGATGA
12.	OPAU-14	CACCTCGACC
13.	OPAX-01	GTGTGCCGTT
14.	OPAK-10	CAAGCGTCAC
15.	OPC-16	CACACTCCAG

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' ⟶ 3'
16.	OPC-2	GTGAGGCGTC
17.	OPJ-20	TGCCCGTCGT
18.	OPQ-20	TCGCCCAGTC
19.	UBC-34	CCGGCCCCAA
20.	UBC-63	TTCCCCGCCC
21.	UBC-84	GAGGGCGAGC
22.	UBC-85	GGGCGCGAGT
23.	UBC-88	GTGCTCGTGC
24.	OPA-02	CGGGGGATGG
25.	OPA-04	AATCGGGCTG
26.	OPU-07	CCTGCTCATC
27.	OPAD-9	TCGCTTCTCC
28.	OPAN-10	ACAACTGGGG
29.	OPP-08	CCGTGACTCA
30.	UBC-05	CCTGGGTTCC
31.	UBC-18	GGGCCGTTTA
32.	UBC-51	CTACCCGTGC
33.	UBC-106	GTCTGCCCG
34.	UBC-24	ACAGGGGTGA
35.	UBC-67	GAGGGCGAGC

4.5 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตร 25 µl ลงใน Eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ประกอบด้วย 1X reaction buffer, dNTPs (dATP, dTTP, dGTP และ dCTP) อย่างละ 200 µM primer 50 – 100 ng, *Taq* DNA polymerase 1 Unit ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) 10-25 ng และน้ำกลั่น จากนั้นเพิ่มปริมาณขยายดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6 เงื่อนไขของปฏิกิริยา (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR

อุณหภูมิ	95° C	95°C	40°C	72°C	72°C	4°C
ระยะเวลา	5 min	45 sec	45 sec	90 sec	10 min	α
จำนวนรอบ	1	I ← 30 รอบ →			I	1

4.7 การวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis

วิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซิส ทำเช่นเดียวกับการทดลองแรก โดยสังเกตการปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์

4.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจดูตำแหน่งที่มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วลันเตาแต่ละสายพันธุ์ บันทึกผลโดยใช้ระบบตัวเลข คือการปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยบันทึกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์ เพื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ สังเกตแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะพันธุ์ที่ต้านทานโรค

สถานที่ทดลอง

1. สถานีวิจัยเกษตรหลวงปางดะ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่
2. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการอณูโมเลกุลมูลนิธิโครงการหลวง อ.เมือง จ.เชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการ โครงการย่อยบัณฑิตและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (CMU-Ag Biotect) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
5. ห้องปฏิบัติการอณูโมเลกุล ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยแห่งชาติจงชิง จ.ไทจง ไต้หวัน

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

มกราคม พ.ศ. 2553 ถึง มกราคม พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved