บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

1. พืชทดลอง

เมล็ดข้าว จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ105 (*Oryza sativa* L. cv KDML105) DH212 Pokkali (พันธุ์มาตรฐานทนเค็ม) และ IR29 (พันธุ์มาตรฐานอ่อนแอต่อความเค็ม) และ ข้าวในกลุ่มประชากร CSSL จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ CSSL10 CSSL11 CSSL12 CSSL16 CSSL26 และ CSSL27 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ธีรยุทธ ตู้จินดา หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ทำการทดลองในการศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืช

2.1 วัสดุอุปกรณ์ในการปลูกพืช

- กระปุกพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว สูง 1.5 นิ้ว
- กระถางพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นิ้ว
- ดินเหนียว (ชุดดินนครปฐม สำนักสำรวจดินและวิจัยทรัพยากรดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)
- บ่อปูนซีเมนต์ขนาด 90x180 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร
- เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Digital conductivity meter)
- เครื่องวัด pH (pH meter)
- ปั๊มน้ำ
- ไม้เมตร

2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืช

- เครื่องวัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (Portable photosynthesis system (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA))
- ไม้เมตร
- ไม้บรรทัด

- สายวัด
- นาฬิกาจับเวลา
- ตู้อบตัวอย่างพืช (Hot air oven)
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่งของหน่วยกรัม
- กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (Canon รุ่น IXY)

3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ทำการทดลองในการศึกษาการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ transcription

3.1 วัสดุอุปกรณ์ในการปลูกพืช

- กระปุกพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว สูง 1.5 นิ้ว
- กระถางพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว
- ดินเหนียว (ชุดดินนครปฐม สำนักสำรวจดินและวิจัยทรัพยากรดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)
- บ่อปูนซีเมนต์ขนาด 171x225 เซนติเมตร สูง 35 เซนติเมตร
- เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Digital conductivity meter)
- เครื่องวัด pH (pH meter)
- ปั๊มน้ำ
- ไม้เมตร

3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด RNA

- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Deep freezer)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freezer)
- เครื่องวัด pH (pH meter)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge, Universal 2R, Hettich, Germany)
- Microcentrifuge tube
- ไมโครปิเปต (Gilson, France)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixture)

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น G1103A บริษัท Agilent Technologies ประเทศเยอรมนี)
- ข้อนตักสาร
- อะลูมินั่มฟอยล์
- โกร่งบด
- ปากคีบ
- Water bath
- Dry bath incubator (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
- Pipette tips ขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร
- กระติกใส่ไนโตรเจนเหลว
- กระบอกใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ เอทิลแอลกอฮอล์
- ถุงมือ
- หน้ากากอนามัย
- กล่องใส่น้ำแข็ง
- นาฬิกาจับเวลา

3.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ใน electrophoresis

- Gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou BIOER Technology Co., Ltd., China)
- Gel Doc™ 2000 และ UV transsilluminator (Bio-Rad, USA)
- เตาอบไมโครเวฟ

3.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ใน real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

- iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, California)
- Dry bath incubator (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Deep freeze)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freeze)
- เครื่องวัด pH (pH meter)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge, Unversal 32R, Hettich, Germany)
- Microcentrifuge (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
- Microcentrifuge tube
- ไมโครปิเปต (Gilson, France)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixture)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น G1103A บริษัท Agilent Technologies ประเทศเยอรมันนี)
- Gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou BIOER Technology
  96-well plate (Bio-Rad, California)

4. สารเคมีที่ใช้ทำการทดลอง

4.1 สารเคมีที่ใช้ในการปลูกพืช

- สารละลายธาตุอาหารสูตรอาหารของศูนย์เกษตรกรรมบางไทร (ศูนย์เกษตรกรรมบางไทร)
- Sodium chloride (NaCl)

4.2 สารเคมีใช้ในการสกัด RNA

- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
- ไนโตรเจนเหลว
- RNA Extraction buffer (การเตรียมดังภาคผนวก ข)
- Phenol : Chlorofrom ; isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v) (การเตรียมดังภาคผนวก ข)
- Absolute ethanol (Liquid Distillery Organization Excise Dept, Thailand)
- Ethyl alcohol (C_2H_6O) (Merck, Germany)
- TE buffer (การเตรียมดังภาคผนวก ข)
- Lithium chloride ($LiCl_2$) (Sigma Chemical Company, USA)
- Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich Co., USA)

- DEPC-treated TE Buffer (การเตรียมดังภาคผนวก ข)
- DEPC –treated Water (การเตรียมดังภาคผนวก ข)
- Chloroform (Merk, Germany)
- Sodium acetate (CH_3COONa) (Sigma-Aldrich Co., USA)
- 2-mercaptoethanol (Merk, Germany)
- Recombinant DNase I (Takara, Japan)

4.3 สารเคมีที่ใช้ใน electrophoresis

- Agarose (Research Organics, USA)
- 5X TBE buffer (Tris Borate EDTA) (การเตรียมดังภาคผนวก ข)
- Ethidium bromide (Gibco BRI, USA)
- DNA/RNA loading dye (การเตรียมดังภาคผนวก ข)

4.4 สารเคมีที่ใช้ใน real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

- RQ1 Rnase-free *DNase*I (Takara Bio Inc., Japan)
- M-MLV reverse Transcriptase (Promega, USA)
- SsoFast™ Evagreen® Supermix (Bio-Rad, USA)
- Phenol : Chlorofrom ; isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v) (การเตรียมดังภาคผนวก ข)
- DEPC-treated TE Buffer (การเตรียมดังภาคผนวก ข)
- Ethyl alcohol (C_2H_6O) (Merck, Germany)
- Sodium acetate (Sigma-Aldrich Co., USA)

5. ขั้นตอนและวิธีดำเนินการทดลอง

5.1 ศึกษาระดับความเข้มข้นเกลือ และระยะเวลาที่ทำให้ต้นข้าวเกิดภาวะเครียดจากความเค็ม

5.1.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของข้าว 4 พันธุ์คือ

- พันธุ์ KDML105 (ขาวดอกมะลิ 105)
- พันธุ์ DH212
- พันธุ์ Pokkali

- พันธุ์ IR29

โดยให้ต้นข้าวได้รับความเค็มที่ระดับต่าง ๆ คือ ภาวะปกติ (ไม่ได้รับความเค็ม) ภาวะที่ได้รับความเค็มมีสารละลายเกลือ NaCl เข้มข้น 75 mM และ ภาวะที่ได้รับความเค็มสารละลายเกลือ NaCl 150 mM ทำการให้ความเค็มเมื่อต้นข้าวมีอายุ 1 เดือน (30 วัน)และเก็บผลการทดลองหลังจากต้นข้าวได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 0 7 14 21 และ 28 วัน

5.1.2 เตรียมต้นกล้าข้าว โดยมีวิธีการดังนี้

5.1.2.1 ทำการเพาะเมล็ดข้าวในน้ำเป็นเวลา 5 วัน จนมีรากงอก

5.1.2.2 ย้ายเมล็ดที่มีรากงอกลงกระถางพลาสติกสีดำขนาด 10 นิ้วที่บรรจุดิน จำนวน 1 ต้นต่อกระถาง และทำการขังน้ำเปล่าเป็นเวลา 8 วัน

5.1.2.3 เติมสารละลายธาตุอาหาร (1:100) สูตรอาหารของศูนย์เกษตรกรรมบางไทร (ศูนย์เกษตรกรรมบางไทร 2555)(ศูนย์เกษตรกรรมบางไทร 2555)(ศูนย์เกษตรกรรมบางไทร 2555)(ศูนย์เกษตรกรรมบางไทร 2555) ซึ่งมีรูปแบบของธาตุอาหารใกล้เคียงกับสูตรของ Yoshida ในวันที่ 14 หลังการเพาะเมล็ด โดยให้มีระดับสารละลายสูง 23 เซนติเมตร จากพื้นบ่อปลูก

5.1.3 นำต้นข้าวที่ได้ในข้อ 5.1.2 ทั้งหมดให้ได้รับภาวะความเค็มโดยทำการเติมสารละลายเกลือให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ 0, 75, และ 150 mM เมื่อต้นข้าวอายุ 30 วันหลังการเพาะเมล็ด และรักษาระดับความเค็มโดยการตรวจสอบค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย (Electrical conductivity, EC) ให้อยู่ในระดับคงที่เมื่อเริ่มให้ความเค็มของน้ำ โดยระดับความเข้มข้นที่ 0 mM มีค่า EC ประมาณ 1 dS/m ความเข้มข้นที่ 75 mM มีค่า EC ประมาณ 8 dS/m และ ความเข้มข้นที่ 150 mM มีค่า EC ประมาณ 16 dS/m

5.1.4 บันทึกผลการเจริญเติบโตของข้าว โดยวัดพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ระยะเวลา 0 7 14 21 และ 28 วันหลังจากได้รับภาวะเค็ม ดังนี้

- จำนวนกอ
- ความกว้างใบของใบแท้ที่อายุน้อยที่สุดและเจริญเต็มที่ (Youngest fully expanded leaf)
- ความสูงต้น
- จำนวนใบทั้งหมดต่อต้น

เมื่อครบ 28 วันทำการเก็บค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของใบทั้งหมด

5.1.5 วัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยใช้เครื่อง portable photosynthesis system (Li-6400, LI-COR, Lincoln, NE, USA) ซึ่งมีการติดตั้ง blue–red LED light source (LI-6400-02B) และ CO_2 injection system (LI-6400-01) โดยกำหนดค่าความเข้มของแสงที่ 1,200 umol PPFD m^{-2} s^{-1} ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50-80 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในอากาศเท่ากับ 380 umol mol^{-1} และอุณหภูมิอากาศในช่วง 30 – 34°C เลือกใช้ใบแท้ที่อายุน้อยที่สุดและเจริญเต็มที่ ทำการเก็บข้อมูลหลังจากได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 0 7 14 21 และ 28 วัน เก็บข้อมูล 4 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น ต้นละ 3 กอ โดยค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย

5.1.5.1 อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุด (Maximum photosynthetic rate, A_{max})

5.1.5.2 อัตราการคายน้ำ (Transpiration, T)

5.1.5.3 ค่าการชักนำการเปิดของปากใบ (Stomatal conductance, g_s)

5.1.5.4 ประสิทธิภาพการใช้น้ำ (*Water Use Efficiency,* WUE) ของต้นข้าว โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{WUE } (\mu\text{mol } CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}\ \text{mmol } H_2O) = \frac{\text{อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุด } (A_{max})}{\text{อัตราการคายน้ำ } (T)}$$

5.1.5 วัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยใช้เครื่อง portable photosynthesis system (Li-6400, LI-COR, Lincoln, NE, USA) โดยกำหนดค่าความเข้มของแสง 1,200 μmol PPFD m^{-2} s^{-1} ความชื้นสัมพัทธ์ 50-80 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในอากาศเท่ากับ 380 umol mol^{-1} และอุณหภูมิอากาศ 30 – 34°C เลือกใช้ใบข้าวที่แผ่ออกเต็มที่มีอายุน้อยที่สุด ทำการเก็บข้อมูลหลังจากได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 0 7 14 21 และ 28 วัน เก็บข้อมูล 4 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ต้นละ 3 กอ โดยค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย

5.1.6 เก็บค่า pH และEC (ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย) ของดินและน้ำในแต่ละระดับความเค็ม ทุกสัปดาห์ในช่วงที่เก็บผลการทดลอง ตามวิธีการของ กรมพัฒนาที่ดิน (2557) (ดังภาคผนวก ก)

5.1.7 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบลักษณะการตอบสนองทางสรีรวิทยา ได้แก่ จำนวนกอ ความกว้างใบของใบแท้ที่มีอายุน้อยที่สุดและเจริญเต็มที่ ความสูงต้น จำนวนใบทั้งหมดต่อต้น รวมถึงอัตราการการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงสุด (A_{max}) อัตราการคายน้ำ (T) ค่าการชักนำการเปิดของปากใบ (g_s) และประสิทธิภาพการใช้น้ำของต้นข้าว โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) เพื่อหาระดับความเค็มและช่วงเวลาที่ทำให้เห็นความแตกต่างของการตอบสนองต่อความเค็มที่ชัดเจนเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

5.2 เปรียบเทียบอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงของข้าวในประชากร CSSL ซึ่งได้รับชิ้นส่วนของโครโมโซมที่1 อยู่ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RM212 และ RM5310 ที่มีขนาดชิ้นส่วนต่างๆกันในภาวะเค็มและภาวะปกติ

5.2.1 วางแผนการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยทำการศึกษาในข้าวในกลุ่มประชากร CSSL ที่มีชิ้นส่วนขนาดต่างๆ ของโครโมโซมที่ 1 จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่

- สายพันธุ์ CSSL10
- สายพันธุ์ CSSL11
- สายพันธุ์ CSSL12
- สายพันธุ์ CSSL16
- สายพันธุ์ CSSL26
- สายพันธุ์ และ CSSL27

และพันธุ์ทดสอบที่ได้ศึกษาไว้ในข้อ 2 อีก 4 พันธุ์ คือ

- พันธุ์ KDML105 (ขาวดอกมะลิ 105)
- พันธุ์ DH212
- พันธุ์ Pokkali
- พันธุ์ IR29

เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และลักษณะการตอบสนองในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เมื่อต้นข้าวอายุ 1 เดือน (30 วัน) ได้รับภาวะเค็มที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ที่ช่วงเวลา 0 6 12 และ 18 วันหลังได้รับภาวะเค็ม

5.2.2 เตรียมต้นกล้าข้าว โดยนำเมล็ด มาเพาะเมล็ดกล้าในดินตามข้อ 5.1.2

5.2.3 นำต้นข้าวในข้อ 5.1.3 ให้ได้รับภาวะความเค็มโดยทำการเติมสารละลายเกลือให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ 0, 75 และ 150 mM เมื่อต้นข้าวอายุ 30 วันหลังการเพาะเมล็ด

5.2.4 วัดอัตราการเจริญเติบโตตามข้อ 5.1.4 ทำการเก็บข้อมูลที่ช่วงเวลา 0 6 12 และ 18 วันหลังได้รับภาวะเค็ม

5.2.5 วัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงตามข้อ 5.1.5 ทำการเก็บข้อมูลที่ช่วงเวลา 0 6 12 และ 18 วันหลังได้รับภาวะเค็ม เก็บข้อมูล 4 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ต้นละ 3 กอ กอละ 1 ใบ

5.2.6 เก็บค่า pH และ EC ของดินและน้ำในแต่ละระดับความเค็ม (กรมพัฒนาที่ดิน 2557) ทุกสัปดาห์ในช่วงที่เก็บผลการทดลอง

5.2.7 วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ โดย ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT เพื่อคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่มีอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงดีสุดเมื่อได้รับภาวะเค็ม เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

5.3 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ transcription ของยีน *Chlorophyll a-b binding protein (PsbS1)* ในข้าวสายพันธุ์ CSSL ที่มีความสามารถในการต้านทานความเค็ม

จากผลการศึกษาในข้อ 4 นำสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต้านทานความเค็มมากที่สุดจากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง 4 สายพันธุ์ ได้แก่

- สายพันธุ์ CSSL11
- สายพันธุ์ CSSL16
- สายพันธุ์ CSSL26
- สายพันธุ์ CSSL27

มาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PsbS1* ในระดับ transcription เมื่อได้รับภาวะเค็ม กับการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์ KDML 105 (ขาวดอกมะลิ 105) และ พันธุ์ DH212 โดยใช้วิธี quantitative RT-PCR ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

5.3.1 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative RT-PCR ด้วยเครื่อง iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad) โดยใช้เอนไซม์ SsoFast™ Evagreen® Supermix (Bio-Rad) ตามที่ระบุไว้ในเครื่องมือ (ภาคผนวก ข) แต่ละตัวอย่างทำปฏิกิริยา 3 ครั้ง และนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป

5.3.1.1 ทำการศึกษาข้อมูลทาง bioinformatics ของยีนดังกล่าวจากฐานข้อมูลสากล โดยนำตำแหน่งเนื้อเยื่อส่วนใบ ที่เวลา 0 6 12 และ 18 วันหลังได้รับภาวะเค็มที่ 0 และ 150 mM มาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

5.3.1.2 ออกแบบ primer เพื่อใช้ตรวจสอบเบื้องต้นของยีนดังกล่าวที่มีการแสดงออก

5.3.1.3 เตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชที่ได้จากการศึกษาตามแผนการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ในข้อ 5.2 โดยเลือกข้าวในประชากร CSSL ได้แก่ CSSL11 CSSL16 CSSL26 และ CSSL27 และข้าวพันธุ์ KDML 105 และ DH212

5.3.1.4 สกัด total RNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชตามวิธีของ Thikart และคณะ (2005) (ภาคผนวก ข)

5.3.1.5 วัดปริมาณ RNA จากสารละลายที่สกัดได้ โดยวัดความเข้มข้นของสารละลายที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย 0.8% agarose gel (w/v) ในสารละลาย 0.5x TBE และ gel

electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd) ย้อมแถบ RNA ด้วย ethidium bromide แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)

5.3.1.6 กำจัด DNA ออกจาก RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Takara) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ (ภาคผนวก ข) แล้วนำมาคำนวณปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของ RNA อีกครั้งเช่นเดียวกันกับในข้อ 5.3.2.5

5.3.1.7 สร้าง cDNA โดยใช้ oligo$(dT)_{15}$ เป็น primer ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, NI, USA) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ (ภาคผนวก ข)

5.3.1.8 ทำการออกแบบ primer เพื่อใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี quantitative RT-PCR โดยมีการออกแบบ primer ดังนี้

Primer สำหรับยีน *PsbS1* มีลำดับเบสดังนี้

PsbS1(F) 5'-GCATCGCCTTCTCCATCA-3'

PsbS1(R) 5'-GAAGACGACGTTGAAGAGGA-3'

5.3.1.9 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกได้จากข้าวในกลุ่มประชากร CSSLได้แก่ CSSL11 CSSL16 CSSL26 และ CSSL27 และ ข้าวพันธุ์ KDML 105 และ DH212 ในภาวะปกติ 0 mM และที่ได้รับภาวะเค็ม 75 mM ที่ช่วงเวลา 0 6 12 และ 18 วันหลังได้รับภาวะเค็ม โดยวางแผนการทดลองแบบ complete randomized design (CRD) มีตัวอย่าง 3 ซ้ำ ต่อพันธุ์

5.3.1.10 นำผลที่ได้จากข้อ 5.3.1.8 มาคำนวณหาการแสดงออกของยีน *PsbS1*ด้วยวิธีเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษากับการแสดงออกของยีนที่ใช้เป็น control (relative quantification) โดยมียีน *EF1*α เป็นยีนอ้างอิง ซึ่งมีการใช้ forward prime 5'-ATGGTTGTGGAGACCTTC-3' และ reverse primer 5'-TCACCTTGGCACCGGTTG-3' ซึ่งจำเพาะต่อยีน *EF1*α เพื่อใช้เป็น internal control (ศิริพร ศรีภิญโญวณิชย์ 2554) หาค่าการแสดงออกของยีนด้วยวิธี DDCT method (Pfaffl 2001) โดย normalize ระดับการแสดงออกของยีนที่เลือกกับระดับการแสดงออกของยีน *EF1*α ดังสมการ

$$R = \frac{(E_{target})^{\Delta CP target(Control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP target(Control-sample)}}$$

โดยที่ R คือ relative expression ratio

E_{target} คือ $10^{-1/slope}$ ของยีน *PsbS1*

E_{ref} คือ $10^{-1/slope}$ ของยีน *EF1α*

ΔCP_{target}(control-sample) คือ ผลต่างระหว่างค่า CP (cross-over point) (หรืออีกชื่อคือ ค่า Ct; threshold cycle) ของยีน *PsbS1* เมื่อเปรียบเทียบกับค่า CP ของตัวอย่าง control

ΔCP_{ref}(control-sample) คือ ผลต่างระหว่างค่า CP ของยีน *EF1α* เมื่อเปรียบเทียบกับค่า CP ของตัวอย่าง control

5.3.2 วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

6. สถานที่ทำการทดลอง

โรงเรือนปลูกพืชทดลองหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และห้องปฏิบัติการของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย