เครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มที่คัดเลือกจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นางสาววิจิตรา สมรรคนัฏ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-1322-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC MARKER OF SALT TOLERANT RICE SELECTED FROM TISSUE CULTURE

MISS VIJITTRA SAMUKKANUT

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Sumitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2000

ISBN 974-13-1322-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มที่คัดเลือกจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ
โดย	นางสาววิจิตรา สมรรคนัฏ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ มนทกานติ วัชราภัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ มนทกานติ วัชราภัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิราวุธ กลิ่นบุหงา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจิตรา สมรรคนัฏ : เครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มที่คัดเลือกจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (GENETIC MARKER OF SALT TOLERANT RICE SELECTED FROM TISSUE CULTURE) อ.ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์มนทกานติ วัชราภัย , อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ; 80 หน้า. ISBN 974-13-1322-5

การชักนำแคลลัสของข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์กข 23 จากการเลี้ยงเอ็มบริโอที่เจริญเต็มที่บนอาหารที่ต่างกันห้าสูตร สูตรของสุดารัตน์ นิติวัฒนะ (2538) เป็นสูตรที่ถูกนำมาใช้เพื่อการศึกษาต่อไป โดยได้ embryogenic callus ทั้งหมดและแคลลัสที่ได้มีขนาดใหญ่กว่าสูตรอื่น

การศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มเลือกใช้สายพันธุ์ทนเค็ม (กข23TC7 และ กข23TC28) ที่คัดเลือกมาจาก somaclone การศึกษานี้ใช้เทคนิค DAF และ RAPD โดยมีไพรเมอร์ UBC และ CU ตามลำดับ ผลคือ UBC457 (CGACGCCCTG) ให้แถบดีเอ็นเอหนึ่งแถบในข้าวกข23TC7 ที่ต่างจากสายพันธุ์หลัก ซึ่งเมื่อใช้ไพรเมอร์ CU2 (CCACAGCAGT) ได้หนึ่งแถบเช่นกัน ในทางตรงข้ามเมื่อใช้ไพรเมอร์ CU1 (GTTTCGCTCC) พบแถบดีเอ็นเอทั้งในข้าวกข23TC7 และ กข 23TC28 แต่ไม่พบในสายพันธุ์หลัก และเมื่อใช้ไพรเมอร์ CU กับลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ทนเค็มและสายพันธุ์หลัก พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายบ้างบางต้น ดังนั้นแถบดีเอ็นเอเป้าหมายนี้น่าจะใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมบ่งบอกความสามารถในการทนเค็มของข้าวกข23 ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4072423823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : RAPD / SALT TOLERANT / RICE

VIJITTRA SAMUKKANUT : GENETIC MARKER OF SALT TOLERANT RICE SELECTED FROM TISSUE CULTURE. THESIS ADVISOR : PROF. MONTAKAN VAJRABHAYA, PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D. , 80 pp. ISBN 974-13-1322-5

Calli of rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD23 were obtained from mature embryos by culturing mature embryos on five different media. Only Nitiwatana medium (1995) was selected for futher experiments. All calli obtained from this medium were of embryogenic type and bigger than other media.

The studies on genetic markers for salt tolerant was carried out using selected salt tolerant lines (RD23TC7 and RD23TC28) obtained from somaclones. These were done by using DAF and RAPD techniques with UBC and CU primers respectively. The results obtained when using UBC 457 (CGACGCCCTG) showed one DNA band in RD23TC7 which differed from the original line, this also obtained when using CU2 (CCACAGCAGT) primer on the same line. On the contrary, when using CU1 (GTTTCGCTCC) primer the band appeared on both RD23TC7 and RD23TC28 but not original line. When using the CU primers, the target DNA band on some of the offspring between the salt tolerant and the original lines can also be detected. This target DNA band may be used as genetic marker for salt tolerant rice lines.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department……..… Student's signature…….

Field of study Biotechnology Advisor's signature……

Academic year 2000 Co-advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจากศาสตราจารย์ มนทกานติ วัชราภัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการวิจัย ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธ์ และ อาจารย์ ดร.ศิราวุธ กลิ่นบุหงา ที่ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีที่ได้ให้ความสะดวกในการฝึกผสมพันธุ์ข้าว

กราบขอบพระคุณ ดร.ลือชัย อายะรังสฤษฎ์ และคุณสุภาพร จันทร์บัวทอง ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือมาโดยตลอด

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นพ.ยง ภู่วรวรรณ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องทำ PCR

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณจักรี เกียรติบุตร และ คุณถนอม น้อยหมอ ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์และการจัดเรียงภาพ

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขออุทิศความดีของวิทยานิพนธ์เล่มนี้แด่ คุณพ่อจรัญ สมรรคนัฏ ที่ได้ล่วงลับไปแล้ว คุณแม่ และพี่สาว ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการเงินและให้กำลังใจเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
3. อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย.....17
4. ผลการทดลอง.....30
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....54
6. สรุปผลการทดลอง.....62

รายการอ้างอิง.....63

ภาคผนวก.....70

ประวัติผู้เขียน.....80

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	อัตราการรอดตายของข้าวเมื่ออยู่ในสารละลายปุ๋ยสูตร WP No.2 ที่เติมเกลือ NaCl 0.3%เป็นเวลา 4 สัปดาห์	30
2	น้ำหนักสดของแคลลัส(กรัม) เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร A CW M-019 SK-1 และY เป็นเวลา 3 สัปดาห์	31
3	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัส	34
4	ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดของแคลลัสและลักษณะแคลลัส	34
5	เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสและต้นกล้าที่ความยาวคลื่น 260,280,320 nm. อัตราส่วนระหว่าง OD260:280 และ ปริมาณดีเอ็นเอที่คำนวณได้ของแคลลัสและต้นกล้า	36
6	จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึม โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย UBC primer ด้วยเทคนิค DAF ในแคลลัสของข้าวกข23สายพันธุ์หลัก และสายพันธุ์ทนเค็มทั้ง 2 สายพันธุ์	37
7	จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึม โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย UBC primer ด้วยเทคนิค DAF ในต้นกล้าของข้าวกข23สายพันธุ์หลัก และสายพันธุ์ทนเค็มทั้ง 2 สายพันธุ์	38
8	เปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ใช้ชักนำแคลลัส	56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ UBC457 โดยเทคนิค DAF ใน 8% polyacrylamide gel ที่ย้อมด้วยเงิน	40
2.	แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ UBC228 UBC456 UBC457 และ UBC459 โดยเทคนิค DAF ใน 8% polyacrylamide gel ที่ย้อมด้วยเงิน	41
3.	แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ UBC228 และ UBC459 โดยเทคนิค DAF ใน 8% polyacrylamide gel ที่ย้อมด้วยเงิน	42
4.	แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ UBC457 และ UBC456 โดยเทคนิค DAF ใน 8% polyacrylamide gel ที่ย้อมด้วยเงิน	43
5.	แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ CU1 โดยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel	44
6.	แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ CU2 โดยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel	44
7.	แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ CU3 โดยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel	45
8.	แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ CU4 โดยเทคนิค RAPD ใน 1,5% agarose gel	45
9.	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU1	46
10.	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU1	47
11.	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU2	48
12.	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU2	49
13.	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU3	50
14.	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU3	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

15. แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU4.....52

16. แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU4.....53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

Bis	=	N,N'-methylene-bisacrylamide
bp	=	base pair(s)
CTAB	=	Cetyl trimethyl ammonium bromide
DAF	=	DNA amplification fragment
DNA	=	deoxyribonucleic acid
Dnase	=	Deoxyribonuclease
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
DW	=	distilled water
EDTA	=	ethylene diamine tetra-acetic acid
g.	=	Gram
μg.	=	Microgram
kb	=	Kilobase
kD	=	KiloDalton
l	=	Litre
μl.	=	Microlitre
M	=	Molar
μM	=	Micromolar
mg.	=	Milligram
min.	=	Minute
ml.	=	Milllilitre
mM	=	Millimolar
mm.	=	Millimeter
ng.	=	Nanogram
nm.	=	Nanometer
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis
RAPD	=	Random amplified polymorphic DNA
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
Taq	=	*Thermus aquaticus* DNA polymerase
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethylenediamine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	=	Unit(s)
V	=	Volts
W	=	weight

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ปัญหาสำคัญอันหนึ่งของการเพาะปลูกข้าวในประเทศไทย คือปัญหาพื้นที่แห้งแล้งและสภาพดินเค็มซึ่งมักจะพบควบคู่กันไปและส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวลดต่ำลงโดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งเป็นแหล่งปลูกข้าวส่วนใหญ่ของประเทศ การแก้ไขปัญหาอาจทำได้โดยการปรับปรุงสภาพพื้นที่เพาะปลูกโดยวิธีการเขตกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้มีการคัดเลือกหาสายพันธุ์ทนเค็มหรือแล้งหลายวิธีด้วยกัน เช่น การนำสายพันธุ์มาจากต่างประเทศ การผสมและคัดพันธุ์ ตลอดจนการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ และการสร้างสายพันธุ์โดยการตัดต่อยีน

Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1991) ค้นพบความผันแปรของเซลล์ร่างกายที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (somaclonal variation) ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการทนเค็มโดยให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไว้เหมือนพันธุ์เดิมเพิ่มแต่เพียงคุณสมบัติของความสามารถในการทนเค็ม

โครงการ New Varieties of Rice for Saline and Acid Soil Through Tissue Culture โดยศาสตราจารย์ มนทกานติ วัชราภัย ได้ใช้ประโยชน์ของการเกิดความผันแปรของเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation) จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผลิตข้าวพันธุ์ใหม่ที่ทนเค็มและทนแล้งสูง และสามารถถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวไปยังชั่วอายุต่อ ๆ ไปได้ (Vajrabhaya et al., 1987) จากการวิจัยอย่างต่อเนื่อง ทิพยวรรณ ธนไพศาล (2534) ศึกษาความทนเค็มของข้าวที่ได้มาจากโครงการดังกล่าว 8 พันธุ์ คือ กข25 กข23 กข8 ขาวดอกมะลิ 102 นางมล เอส-4 เหนียวสันป่าตอง เหลืองประทิว123 และขาวตาแห้ง 17 โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่เกิดจาก somaclonal variation แล้วมาคัดเลือกต่อในรุ่นที่ 2-5 (R2-R5) โดยการเติม NaCl 0.5% ในสารละลายธาตุอาหารทำให้มีค่าการนำไฟฟ้า 9-10 mmho/cm ที่ 25 องศาเซลเซียส คัดเลือกต้นกล้าที่ระยะ 5 ใบด้วยวิธี hydroponic เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นที่รอดตายมาปลูกเก็บเมล็ดในดินปกติ

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับความสามารถในการทนเค็มที่ผ่านมา นอกจากการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา เช่น การตอบสนองต่อไอออนของโซเดียมและคลอไรด์ การสะสมสารละลายอินทรีย์ เช่น โปรตีน น้ำตาล กรดอะมิโนบางชนิด กรดอินทรีย์บางชนิดและกรดแอสคอร์บิค (Olmos and Hellin,1996) แล้วยังมีการเปลี่ยนแปลงในด้านของสารพันธุกรรม ยีนต่างๆ และการแสดงออกของยีน เช่น การเปลี่ยนแปลงระดับอาร์เอ็นเอและเอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอส เมื่ออยู่ในภาวะเค็ม (Mittal and duby,1990) การแสดงออกของยีน *germin rab*16 *rbc*L *sal*T ที่

นำไปสู่การประยุกต์ใช้ในเทคนิคใหม่ของการปรับปรุงพันธุ์พืช คือ การสร้างสายพันธุ์ใหม่โดยการตัดต่อยีน (Zhang *et al.* , 1995b. , Tanaka *et al.* , 1999. , และ Hoshida *et al.* , 2000)

เนื่องจากในงานวิจัยที่ผ่านมาของข้าวที่ได้จากโครงการ มีการศึกษาทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ดังนั้นในส่วนของงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาในด้านชีววิทยาโมเลกุลโดยเปรียบเทียบระหว่างข้าวสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้จากโครงการดังกล่าวเพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) เพื่อใช้เป็นเครื่องชี้บอกถึงความแตกต่างของข้าวทนเค็ม โดยทำการศึกษาในข้าว กข23สายพันธุ์ทนเค็มในรุ่นที่ 9 (R9) วิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบของสารพันธุกรรมระหว่างข้าวกข23สายพันธุ์หลัก(สายพันธุ์ปกติ) กข23สายพันธุ์ทนเค็มและตรวจสอบกลับไปยังลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้จากโครงการกับสายพันธุ์หลักโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งอาจจะนำมาใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวทนเค็มในอนาค

วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยนี้มุ่งศึกษา genetic marker ของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกมาจาก somaclonal variation ที่เกิดในระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อใช้เป็นเครื่องชี้บอกความสามารถในการทนเค็มของข้าว และอาจได้ยีนที่ทนเค็มเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีข้าวเป็นผลผลิตหลัก แม้ว่าในประเทศไทยจะมีกำลังการผลิตในปริมาณที่สูงแต่ความสามารถในการผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศรวมถึงการส่งออกของข้าวไทยนั้นยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร จากการสำรวจพื้นที่ปลูกข้าวในปี 2542 พบว่ามีพื้นที่ ปลูกข้าวนาปี 57.195 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 18.978 ล้านตัน ส่วนพื้นที่ปลูกข้าวนาปรังมี 6.326 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 4.294 ล้านตัน(สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, ธันวาคม 2542) เมื่อนำมาคำนวณเป็นผลผลิตต่อไร่แล้วยังมีปริมาณต่ำอยู่ การปรับปรุงแก้ไขสภาพปัญหาในด้านการ ผลิตจะพบข้อจำกัดในเรื่องของพื้นที่ในการเพาะปลูก แต่ปัจจุบันพบว่าเทคโนโลยีชีวภาพสามารถนำมาใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้และเป็นที่นิยมกันมาก ดังนั้นเพื่อให้ผลผลิตต่อพื้นที่มีมากขึ้นทางออกจึงอยู่ที่การพัฒนาและคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่เหมาะสำหรับสภาพเพาะปลูก เช่น การผลิตข้าว double haploid โดยการเลี้ยงอับเรณู การพัฒนา somaclone เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ทนโรค ทนเค็ม หรือทนแล้ง ตลอดจนการคัดเลือก mutant cell line โดยการเพิ่มกรดอะมิโนเป็นต้น (Semal,1986 และ Bajaj,1991) การผลิตข้าวเพื่อตอบสนองปัญหาในแต่ละพื้นที่ปลูกจึงเป็นสิ่งสำคัญ

การค้นพบการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (somaclonal variation) ในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ของ Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1974) ซึ่งพบความผันแปรของขนาดดอก รูปร่าง สีของกลีบดอก และจำนวนโครโมโซม อีกทั้งลักษณะบางอย่างสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อๆไปโดยพิสูจน์ได้ว่าเกิดจากพันธุกรรมไม่ใช่สิ่งแวดล้อม จึงเป็นที่มาของโครงการ New Varieties of Rice for Saline and Acid Soil Through Tissue Culture (Vajrabhaya, 1987) ซึ่งเป็นโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ไทย เช่น เหลืองประทิว ขาวดอกมะลิ กข23 ขาวตาแห้ง เป็นต้น ทำให้ได้ข้าวที่มีความสามารถทนเค็มและทนแล้งได้ดี จึงได้มีการวิจัยต่อเนื่องเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา (Vajrabhaya และคณะ, 1989, Vajrabhaya และ Vajrabhaya,1991, ทิพยวรรณ ธนไพศาล, 2534, วรัญญา คำปัน, 2542 และ วันชัย สังฆ์สุข, 2542) โดยศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการสะสมโพรลีนและน้ำตาลของข้าวทนเค็มและทนแล้งเมื่อข้าวอยู่ในภาวะเค็มและแล้งกับพันธุ์ปกติ ในการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับความทนเค็มของข้าวพบว่านอกจากจะมีการศึกษาทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาแล้วยังมีการศึกษาเกี่ยวกับสารพันธุกรรม ยีนและกลไกการควบคุมต่างๆ รวมถึงการแสดงออกของยีน ซึ่งเป็นการศึกษาทางด้านชีววิทยาโมเลกุล โดย Claes และคณะ (1990) ศึกษาคุณสมบัติของยีนในข้าวที่แสดงออกในใบและรากเมื่อได้รับภาวะเค็มและแล้งในสายพันธุ์ Taichung N1 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ พบว่าเมื่อข้าวอยู่ในภาวะเค็มและแล้งโดยใช้อาหาร Murashige and

Skook มี ABA 20 μM, PEG 5%, NaCl 1%, KCl 1% และ ภาวะอากาศแห้ง จะมีการแสดงออกของยีนในรูปการสะสม mRNA ในยีน *salT* โดยวัดในใบและราก ซึ่งสัมพันธ์กับ Na^+ ที่เพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะเค็ม จากการศึกษาการสังเคราะห์โปรตีนพบโปรตีนที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออก 8 ชนิด ที่มีขนาดประมาณ 15 kD ในราก และพบว่าฮอร์โมนพืช(ABA) มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับตัวของข้าวเมื่ออยู่ในภาวะเค็มด้วย

Mittal และ Dubey (1990) ศึกษาอิทธิพลของภาวะเค็มต่อระดับของ RNA และกิจกรรมของ RNase ใน endosperm และ embryoaxes ในระหว่างการงอกของเมล็ดข้าวจากส่วนของ endosperm พบว่าเมื่อระดับของความเค็มเพิ่มมากขึ้นพบการสะสมของ mRNA ในสายพันธุ์อ่อนแอ (Ratna และ Jaya) เพิ่มมากขึ้นตาม ในขณะที่สายพันธุ์ทนเค็ม (CSR-1 และ CSR-3) เมื่ออยู่ในภาวะเค็มระดับปานกลาง (7 dSm^{-1}) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ RNA แต่อย่างใด ขณะที่ในส่วนของ embryoaxes พบว่าระดับ RNA ของสายพันธุ์อ่อนแอจะลดลงในช่วง 48-120 ชั่วโมงของการงอก ขณะที่ในสายพันธุ์ทนเค็มมีการเพิ่มขึ้นและยังพบกิจกรรมของ RNase ที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ใน endosperm ของสายพันธุ์ทนเค็มมีกิจกรรมของ RNase มากกว่าสายพันธุ์อ่อนแอ ซึ่งต่างกันใน embryoaxes ภาวะเค็มส่งผลให้ปริมาณ RNase ในสายพันธุ์อ่อนแอเพิ่มมากขึ้นกว่าสายพันธุ์ทนเค็ม ผลการทดลองดังกล่าวสนับสนุนว่าความสัมพันธ์ของปริมาณ RNA และ RNase มีส่วนสัมพันธ์กับการทนเค็มของข้าว

Winicov และ Seemann (1990) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงใน Alfalfa สายพันธุ์ทนเค็ม ในภาวะเค็มพบว่าในสายพันธุ์ทนเค็มภาวะเค็มชักนำให้มีการสะสมทั้ง mRNA และโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงไม่ว่าจะเป็น *rbc*L และ *rbc*S เพิ่มมากขึ้น

Moons และคณะ (1995) ศึกษาการตอบสนองทั้งระดับโมเลกุลและทางสรีรวิทยาของรากข้าว *Indica* เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์อ่อนแอและทนเค็มที่แปรผันกับกรดแอบไซซิค (ABA) และเกลือ (NaCl) พบว่า ABA สามารถกระตุ้นให้มีการตอบสนองของกรดอะมิโน 3 ชนิด ในระหว่างข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม (Pokkali และ Nona Bokra) และสายพันธุ์อ่อนแอ (Taichung N1) โดยพบการสร้างโปรตีนขนาด 40 kD (His-rich) 26 kD (group 3 LEA protein, late embryogenesis abundant protein type I) และขนาด 24 kD (group 2 LEA, Lys-rich / *rab*,dehydrin protein) ในรากของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มทั้งสองสายพันธุ์มากกว่าสายพันธุ์ Taichung N1 และเมื่ออยู่ในภาวะเค็ม(150 mM NaCl) พบว่าระดับของ ABA ของข้าวสายพันธุ์ Nana Bokra เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Taichung N1 จะเพิ่มขึ้น 30 เท่า ส่วนสายพันธุ์ Pokkali จะเพิ่มขึ้น 6 เท่าของสายพันธุ์ Taichung N1

Zhang และคณะ (1996) ศึกษาการแสดงออกของยีน 3 ยีนจากข้าวกลายพันธุ์ที่เป็นพันธุ์ทนเค็มเปรียบเทียบกับพันธุ์ดั้งเดิม ได้แก่ *rbc*L, *sal*T และ *rab*16 ที่ตอบสนองต่อปัจจัยภายนอก ได้แก่ ABA, NaCl, PEG และ heat shock ในระยะกล้า จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ทนเค็มมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนพืช (ABA) จากภายนอกและภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (PEG และ heat shock) น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ทนเค็มมีกลไกบางอย่างที่ช่วยป้องกันตัวเองจากภาวะเครียดทำให้มีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มได้ดีกว่า

Hurkman และ Tanaka (1996) ศึกษาอิทธิพลของภาวะเค็มต่อการแสดงออกของยีน *germin* ในรากข้าวบาร์เลย์พบว่ากลุ่มยีน *germin* ซึ่งคือยีน *oxalate oxidase* (สังเคราะห์ให้ salicylate, methyl salicylate หรือ methyl jasmonate) และยีนที่สังเคราะห์ dehydrin เป็นตัวสำคัญในการปรับสภาวะสมดุลเมื่ออยู่ในภาวะเค็มและในภาวะที่เติมฮอร์โมนพืชบางตัว เช่น ABA และ IAA โดยได้ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกระดับ mRNA กับยีนที่สังเคราะห์ peroxidase โดยวัดในรากของต้นกล้าข้าวบาร์เลย์ที่ระยะเวลาต่างๆ

Olmos และ Hellin (1996) ศึกษากลไกการทนเค็มของ *Pisum sativum* L.cv Challis จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อภาวะเค็มและสายพันธุ์ที่ปรับตัวให้อยู่ใน NaCl 85.5 mM ได้ ทั้งในด้านชีวเคมีและสรีรวิทยา โดยศึกษาในเซลล์ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือ NaCl 85.5 mM ซึ่งพบว่าการพัฒนาของแคลลัสเมื่ออยู่ในภาวะเค็มนั้นขึ้นอยู่กับการปรับตัวในด้านของการปรับค่าออสโมติกภายในเซลล์ นั่นคือการปรับสารละลายอินทรีย์ เช่น โปรตีนบางตัว น้ำตาล กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และกรดแอสคอบิค รวมถึงความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น และกิจกรรมของเอ็นไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับเมตาโบลิซึมของน้ำตาล เช่น glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucokinase, fructokinase และ acid invertase ซึ่งเหมือนกับกิจกรรมของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ pathway ที่พบของโพรลีนและทั้งนี้จะต้องขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์กันของการปรับตัวทางสรีรวิทยาและชีวเคมีควบคู่กันไป

layer และ Caplan (1998) พบว่าสาร intermediate ที่ได้จากการสังเคราะห์โพรลีนสามารถชักนำการแสดงออกของยีนควบคุมค่าออสโมติกในข้าวได้ โดยสาร intermediate ในการสังเคราะห์โพรลีนและกระบวนการแคตาโบลิซึมของโพรลีน เช่น glutamine และ Δ^1-pyrroline-5-carboxylic acid (P5C) สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *sal*T และ *dhn*4 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมค่าออสโมติกในข้าว

โดยสรุปจะพบการแสดงออกของยีนหลายยีนที่อาจจะใช้เป็นเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะทนเค็มได้ ดังนั้นควรเข้าใจถึงรูปแบบและการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องทั้งในระดับ transcription และ translation ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการบ่งบอกลักษณะการทนเค็มได้

สิ่งที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาขั้นต่อไปของข้าวที่ได้จากโครงการจึงเป็นการศึกษาในด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อดูลักษณะและการแสดงออกของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็มและทนแล้ง ซึ่งในงานวิจัยนี้จะศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวเปรียบเทียบระหว่างข้าวสายพันธุ์หลักซึ่งเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ(ไม่ทนเค็ม) กับข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้จากโครงการ

การศึกษาเพื่อนำเครื่องหมายพันธุกรรมมาใช้ในการชี้บอกลักษณะต่างๆหลายลักษณะนั้นเกิดขึ้นอย่างกว้างขวาง เช่น Inukai และคณะ(1996) ใช้ประโยชน์ของการศึกษาหายีนต้านทานโรคไหม้โดยการเปรียบเทียบสายพันธุ์ข้าวลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคไหม้ 2 สายพันธุ์(pre-isogenic lines;PILs และ near-isogenic lines;NILs) ที่มาจากพ่อแม่เดียวกันด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และนำมาพัฒนาข้าวสายพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ โดยขั้นแรกเป็นการพัฒนาข้าวสายพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ซึ่งเกิดจากสายพันธุ์ที่เป็น pre-isogenic lines (การผสมพันธุ์ข้าวระหว่างสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคไหม้(Moroberekan) กับสายพันธุ์อ่อนแอ (CO39) จากนั้นปล่อยลูกผสมที่ได้ผสมตัวเองไปจนถึงรุ่นที่ 7) และใช้เทคนิคการทำแผนที่ยีน (RFLP) มาช่วยในการตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้(ซึ่งได้รับมาจากพันธุ์ Moroberekan) โดยเปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ซึ่งเกิดจากสายพันธุ์ที่เป็น near-isogenic lines (การผสมพันธุ์ข้าวระหว่างสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคไหม้(Moroberekan)กับสายพันธุ์อ่อนแอ (CO39) จากนั้นนำลูกผสมที่ได้ไปผสมกลับ(backcross) กลับไปยังสายพันธุ์ CO39)

Katiyar และคณะ (1994) ใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ในการหาแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับข้าวที่ต้านทานแมลงบั่ว โดยผสมพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ Duokang # 1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานแมลงบั่ว กับข้าวสายพันธุ์ Feng ying Zhan # 1 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ แล้วคัดเลือกจนถึงรุ่นที่ 3 จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสมซึ่งประกอบด้วยลูกผสมที่มีความต้านทานต่อแมลงบั่วกับและลูกผสมที่มีความอ่อนแอต่อแมลงบั่ว โดยใช้เทคนิค RAPD ซึ่งสามารถหาแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการชี้บอกความสัมพันธ์กับการต้านทานแมลงบั่วของข้าวได้

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์เหล่านั้นกันอย่างแพร่หลาย เช่น Zhang และคณะ (1995) ศึกษายีนของข้าวทนเค็มโดยใช้วิธี RFLP ได้เป็นผลสำเร็จ โดยศึกษาในข้าวทนเค็มที่คัดเลือกจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ข้าวทนเค็มที่ได้มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ดั้งเดิมคล้ายกับ near isogenic line และสามารถตรวจสอบยีนทนเค็มโดยใช้ probe RG4 ทำให้ทราบว่าอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 7

Mackill และคณะ (1996) เปรียบเทียบวิธี Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), RAPD และ microsatellite marker ในการศึกษายีนของข้าว ซึ่งจากการศึกษาพบว่าวิธี AFLP เหมาะสมในการใช้ทำแผนที่ยีนที่สำคัญในข้าว เช่นเดียวกันกับ Lin และคณะ (1996) ซึ่งเปรียบเทียบเทคนิค AFLP, RAPD และ RFLP ในถั่วเหลือง โดยพบว่าเทคนิค AFLP จะให้แถบของดีเอ็นเอได้ดีที่สุด

Godwin และคณะ (1997) ใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาความผันแปรและลักษณะทาง phenotype ของข้าว (*Oryza sativa* var. *indica*) ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อสายพันธุ์ FR13A ซึ่งสามารถทนน้ำท่วมและสามารถทนแล้งได้ในระดับปานกลาง ซึ่งพบว่าในกลุ่มของ somaclonal family นั้น มีระดับของดีเอ็นเอที่ผันแปรไปจากพ่อแม่ เมื่อเปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอ(band) กับต้นพ่อแม่ พบว่า มีแถบดีเอ็นเอบางแถบที่หายไปหรือเพิ่มขึ้นมาใหม่ แต่เมื่อดูลักษณะทาง phenotype แล้ว พบว่าระดับของดีเอ็นเอที่เปลี่ยนแปลงไปไม่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกทาง phenotype แต่อย่างใด

จากการศึกษาที่ผ่านมา เทคนิคต่างๆเป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดยการนำเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) มาใช้เพื่อเป็นเครื่องชี้บอกและจัดจำแนกรวมถึงตรวจสอบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ทั้งในระดับโปรตีนและดีเอ็นเอ แต่จะพบว่าการศึกษาในระดับดีเอ็นเอมีข้อได้เปรียบกว่า คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชก็ได้โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน และส่วนของ ดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในนิวเคลียสและออร์กาเนลบางชนิด อันได้แก่ คลอโรพลาสต์ และ ไมโตรคอนเครีย โมเลกุลของดีเอ็นเอนี้มีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำเพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูก และคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวแล้วอาจมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอ หรือการหายไปของโครโมโซม(deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือต่างโครโมโซม (transposition) เกิดขึ้นได้

ปัจจุบันเทคนิคในการศึกษาในด้านชีววิทยาโมเลกุลมีหลายเทคนิค บางเทคนิคอยู่บนหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งจะกล่าวถึงรายละเอียดของแต่ละเทคนิคดังนี้

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในสภาพหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อกลางทศวรรษที่ 1980s โดย Kary B. Mullis และคณะ แห่งบริษัท Cetus Corporation (Mullis,1990) จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย ปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคนิคที่สำคัญมากต่องานด้านชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนยีน การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน(gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม(DNA probe) การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (*in vitro* mutagenesis) และการบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน(point mutations and deletions) เป็นต้น

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase นั้นใช้ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้นมีเพียงเล็กน้อย (ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงระดับนาโนกรัม, 1 นาโนกรัม = 10^{-9}กรัม) ดีเอ็นเอแม่แบบจะเพิ่มเป็นทวีคูณจนมีปริมาณนับล้านชุดสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ทันทีโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแยกชิ้นดีเอ็นเอ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยตรงภายใต้แสง UV หลักการทำ PCR คือ ขั้นแรกต้องทราบลำดับเบสของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน อาจทราบเฉพาะส่วนปลายทั้งสองด้านของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายก็ได้ แล้วจึงสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ 2 ชนิด แต่ละชนิดมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลาย 3′ ของสายดีเอ็นเอที่ต้องการนั้นเพื่อใช้เป็นไพรเมอร์(primer)ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 20-35 เบส แล้วนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ทั้งสองชนิดใส่รวมกับดีเอ็นเอแม่แบบ โดยไม่ต้องแยกเฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมายให้บริสุทธิ์ ใส่ไพรเมอร์ในปริมาณที่มากเกินพอ แล้วเริ่มปฏิกิริยาซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ(denature) จากเกลียวคู่แยกตัวเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วในขั้นที่ 2 เพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับบริเวณของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนอื่นมากๆเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ(annealing) ขั้นสุดท้ายเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่(elongation) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำๆกันหลายๆรอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายก็จะเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2, 4, 8 เท่าไปเรื่อยๆ จนถึง 2^n เท่าเมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ

สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอนคือ

ขั้นแรก Denaturating เป็นการแยกดีเอ็นเอเป้าหมายจากสภาพที่เป็นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สอง Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง และไพรเมอร์สายสั้นๆ (oligonucleotide primers) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายจะเข้าไปจับคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอุณหภูมิส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 25-65 องศาเซลเซียส ขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของเบสในไพรเมอร์ที่ใช้ ทั้งนี้เพราะขนาดและองค์ประกอบของเบสมีผลต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิที่ใช้เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว 50% เรียกว่า melting temperature หรือ Tm สามารถคำนวณค่า Tm โดยประมาณ ได้จากสูตร Tm = 4(G+C) + 2(A+T) โดย G, C, A และ T คือ จำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์นั้น ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส อุณหภูมิสำหรับ annealing จะใช้ประมาณ Tm-5 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สาม Elongation ขั้นตอนนี้เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase จะทำงานโดยเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ สายดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใหม่จะยาวไปเรื่อยๆ จากบริเวณที่ปลายทั้งสองของไพรเมอร์ที่จับอยู่บนสายดีเอ็นเอแม่แบบทั้งสองสาย ทำให้บริเวณที่ต้องการจะถูกจำลองได้โดยสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส

เมื่อสิ้นสุดการทำปฏิกิริยาจากขั้นที่ 1-3 รวมกันเป็นหนึ่งรอบ (one cycle) จะได้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอ 2 สายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่หมุนเวียนไปอีกหลายๆรอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย

ปัจจัยสำคัญสำหรับเทคนิค PCR ประกอบด้วย

1. เอ็นไซม์ DNA polymerase

การค้นพบเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิดที่ทนความร้อนสูงและการสังเคราะห์เส้นใหม่เหล่านั้นโดยเทคนิค Recombinant DNA ทำให้สามารถผลิต *rTaq* DNA polymerase ในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนั้นยังมีการนำเอ็นไซม์ DNA polymerase ที่มีประสิทธิภาพในการทนความร้อนสูงมากกว่ามาใช้ในเทคนิค PCR เช่น เอ็นไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Pyrococcus species* สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 104 องศาเซลเซียส เหมาะสำหรับการทำปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอแม่แบบเป็นโครงสร้าง secondary structure หรือ stable hair-pin loop นอกจากนี้ยังค้นพบโครงสร้างพิเศษของเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่เรียกว่า Stoffel fragment ที่สามารถแสดงแอคทิวิตีได้ดีในช่วงของความเข้มข้น Mg^{2+} ที่กว้าง และการสังเคราะห์ *rTth* DNA polymerase โดยเทคนิค Recombinant DNA ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ทนความร้อนสูงและสามารถแสดงแอคติวิตีได้เป็นทั้งreverse transcriptase ในสภาวะที่มี Mn^{2+} และเป็น DNA polymerase ในสภาวะที่มี Mg^{2+}

เอนไซม์ DNA polymerases ที่ใช้สำหรับเทคนิค PCR ในปัจจุบันมีดังนี้

Taq DNA polymerase (95 องศาเซลเซียส)

Vent DNA polymerase (98 องศาเซลเซียส)

Deep Vent DNA polymerase (104 องศาเซลเซียส)

rTth DNA polymerase (thermostable reverse transcriptase & DNA polymerase)

2. ไพรเมอร์และการออกแบบไพรเมอร์ (Primers and primer design)

ขนาดของไพรเมอร์ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของผู้วิจัยและลำดับเบสของไพรเมอร์ควรมีความสอดคล้องกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากที่สุดเพื่อให้เกิดการจับคู่กันโดยสมบูรณ์ (ยกเว้นการทำ deletion หรือ mutation) บนสายดีเอ็นเอที่เป็นไพรเมอร์ควรมีเบส G และ C ในปริมาณใกล้เคียงกัน ไม่ควรเกิดการจับคู่กันเอง (self complementary) เบส G และ C บนสายไพรเมอร์ ควรมีรวมกัน 50% ขึ้นไป (ควรมีเบส G+C มากกว่าเบส A+T) เพื่อให้การจับคู่กับสายดีเอ็นเอเป้าหมายมีความเหนียวแน่นดีพอ การใช้ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงน้อยและใช้อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมอาจได้ผลผลิตที่ไม่ต้องการ (non-specific product) ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณใดบริเวณหนึ่งของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดนั้นเรียกว่า Universal primers ซึ่งนิยมใช้กันมากในงานวิจัยด้าน molecular systematic และที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ ไพรเมอร์สำหรับ mtDNA(mitochondria DNA) ของสัตว์ cpDNA(chloroplast DNA) และ nrDNA(nuclear ribosomal RNA genes) สิ่งที่ควรพิจารณาในการออกแบบไพรเมอร์ คือ ความยาวของไพรเมอร์ นิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ และการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ

3. ดีเอ็นเอแม่แบบ (template) สายดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณควรเหยียดตรงหรือไม่มี secondary structure และต้องไม่มีสารอื่นที่ยับยั้งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เช่น สารพวก detergent, EDTA, phenol ซึ่งจะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase ปนอยู่

4. การปนเปื้อน (contamination) และ carry over การที่ PCR สามารถเพิ่มดีเอ็นเอได้ปริมาณมากจากแม่แบบที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อย หากมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอแม่แบบก็จะทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ถูกต้อง การเตรียมสารเคมีสำหรับปฏิกิริยาแต่ละหลอดจึงควรระมัดระวังการปนเปื้อนของสารให้มากที่สุด carry over เป็นชื่อเรียกการปนเปื้อนของดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จาก PCR ในหลอดหนึ่งไปสู่อีกหลอดหนึ่ง อันเนื่องมาจากความเข้มข้นที่สูงและปริมาณที่มากของดีเอ็นเอผลผลิตในหลอด บริเวณรอบๆ หลอดและเครื่อง PCR เป็นบริเวณที่มีโมเลกุลของดีเอ็นเอหนาแน่นเป็นพิเศษ จึงเป็นไปได้ที่จะมีการฟุ้งกระจายของโมเลกุลดีเอ็นเอออกมานอกหลอด และปนเปื้อนไปสู่หลอดอื่นๆต่อไปได้อีก ซึ่งจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการวิจัยได้

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เป็นการศึกษาความแตกต่างหรือความหลากหลายโดยดูจากรูปแบบ (profile) ของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ(restriction enzyme) ในพืชจะพบว่าจีโนมของพืชมาจาก 3 แหล่งคือ คลอโรพลาสต์ ไมโตคอนเดรียและนิวเคลียส ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของพืชต่างๆนั้นมีความคล้ายคลึงกัน เมื่อนำมาศึกษารูปแบบของการตัดโดยเอ็นไซม์จำเพาะชนิดต่างๆ จะสามารถบอกความสัมพันธ์ของพืชในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันเหล่านั้นได้ ในทางปฏิบัติเมื่อสกัด ดีเอ็นเอ ตรวจหา RFLP ที่เกิดขึ้นแล้วรวมผลที่ได้ทั้งหมดจากการวิเคราะห์ด้วยเอ็นไซม์หลายชนิดแล้วคิดความแตกต่างของ RFLP ระหว่างแต่ละพันธุ์หรือแต่ละชนิดที่ต้องการตรวจสอบทีละคู่ โดยนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันคือ มีในพืชพันธุ์หนึ่งแต่ไม่มีในพืชอีกพันธุ์หนึ่ง เมื่อได้ตัวเลขทั้งหมดแล้วจึงเขียนแผนที่แสดงความสัมพันธ์ดังกล่าวในรูปต้นไม้ที่มีกิ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักว่าพืชพันธุ์หนึ่งมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงจากกิ่งหนึ่งไปเป็นกิ่งย่อยต่างๆในจำนวนครั้งน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ทั้งนี้โดยการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์หลายโปรแกรม เช่น PHYLIP

ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียมีรูปร่างเป็นวงแหวนเกลียวคู่เช่นเดียวกับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ แต่มีขนาดแปรผันตั้งแต่ 16 kb ในไมโตคอนเดรียของคนจนถึง 200-2,000 kb ในพืช แต่จำนวนยีนที่พบในไมโตคอนเดรียของพืชและสัตว์ไม่ต่างกันนัก สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ RFLP ของดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์นั่นเอง

การศึกษา RFLP ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีวิธีการที่ซับซ้อนกว่า เนื่องจากขนาดของจีโนมที่ใหญ่กว่าและความซับซ้อนของจีโนมมีมาก เมื่อนำดีเอ็นเอจากนิวเคลียสของยูคาริโอตชนิดหนึ่งมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ จะตัดได้ปริมาณมากมาย เช่น ข้าวมีจีโนมขนาดประมาณ $4X10^5$ กิโลเบส เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส จะได้ประมาณ 100,000 ชิ้น ข้าวโพดมีจีโนมขนาดประมาณ $2.5X10^6$ กิโลเบส จะตัดได้ประมาณ 620,000 ชิ้น เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์จะปรากฏเป็นรอยยาวต่อเนื่อง(smear) ไม่สามารถแยกแถบย่อยแต่ละแถบได้ เนื่องจากมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆกันแบบต่อเนื่อง การเปลี่ยนแปลงของเบสและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมจนทำให้เกิด RFLP ในดีเอ็นเอจากแต่ละตัวอย่างยังคงมีอยู่แต่การตรวจสอบนั้นจำเป็นต้องชี้เฉพาะลงไปที่ยีนหรือตำแหน่งจำเพาะบนโครโมโซมโดยใช้โพรบ(probe) ที่สามารถไฮบริไดซ์(hybridize) ได้กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณนั้น และใช้เทคนิคการถ่ายดีเอ็นเอจากเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสลงไปบนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ แล้วนำแผ่นฟิลเตอร์นั้นมาไฮบริไดซ์กับโพรบเพื่อหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกับโพรบที่ใช้โดยวิธี Southern blotting โพรบที่ใช้เป็นดีเอ็นเอสังเคราะห์ขึ้นมาโดยมีเบสคู่สมกับส่วนของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ

ศึกษา นำมาติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารปลอดรังสีบางชนิดเพื่อผลในการติดตามและตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชัน การเกิดโพลีมอร์ฟิซึมมาจากการกลายของเบสในตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์จำเพาะ(target site mutation)หรือมีส่วนของดีเอ็นเอสอดแทรกเข้ามาภายในชิ้นดีเอ็นเอเดิม (insertion) หรือมีส่วนของดีเอ็นเอหายไป(deletion) ทำให้รูปแบบของดีเอ็นเอเปลี่ยนไป

ประโยชน์ในการวิเคราะห์ RFLP นั้นเพื่อสร้าง genetic linkage map ที่แสดงรายละเอียดณ จุด (loci) ต่างๆอย่างมีระบบ ซึ่งให้ผลแม่นยำกว่าการติดตาม phenotype หรือ biochemical markers และยังสามารถติดตามการถ่ายทอดของยีนที่สนใจได้อย่างแม่นยำในรุ่นลูกหลาน เพื่อการวิเคราะห์ pedigree ของครอบครัวประกอบการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม (genetic counseling) ของการเกิดโรคทางกรรมพันธุ์ ในทำนองเดียวกันสามารถนำมาใช้ในการติดตามการถ่ายทอดยีนในพืชและสัตว์เศรษฐกิจที่ทำการคัดและผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้ดีกว่าเดิม การทำแผนที่ RFLP นี้จะช่วยให้ได้ลูกผสมที่มียีนที่ดีรวบรวมจากสายพันธุ์ต่างๆเข้าด้วยกันอย่างรวดเร็ว อันเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้รวดเร็วกว่า conventional breeding นอกจากนี้อาจช่วยในการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของผลิตผลให้คงที่ได้มาตรฐานเพื่อเก็บพันธุ์ (germplasm conservation) ตลอดจนใช้จำแนกสายพันธุ์พืช สัตว์ และมนุษย์ เพื่อตรวจสอบความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม โดยสามารถระบุถึงความสัมพันธ์ระหว่าง species, genus ฯลฯ อันเป็นประโยชน์สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาวิวัฒนาการ(evolution) และความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต (biodiversity) ซึ่งจะทำให้ทราบกำเนิดที่แท้จริงของสิ่งมีชีวิตโดยดูแผนผังความสัมพันธ์ของแผนที่ RFLP เป็นหลักในการจำแนกสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดออกจากกัน ตัวอย่างของการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์ เช่น การศึกษายีนของข้าวทนเค็ม (Zhang *et al*., 1995a) อย่างไรก็ดี ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องมี probe ที่รู้จักก่อนและบางการทดลองจะทำการติดฉลากของ probe ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นเทคนิคที่อาศัยเทคนิค PCR แต่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใดซึ่งเรียกว่า random primer เทคนิค RAPD แบ่งย่อยเป็นหลายวิธี เช่น arbitrarily primed PCR (AR-PCR), DNA amplification fingerprinting (DAF) หรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) แต่ละวิธีมีความแตกต่างกันในไพรเมอร์ที่ใช้และวิธีการที่เลือกใช้ในการวิเคราะผล William และคณะในปี ค.ศ.1990 รายงานการใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโตรโฟรีซีส และตั้งชื่อว่า RAPD DAF ใช้ครั้งแรกโดย Caetano-Anolles และคณะในปี ค.ศ.1991 ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์ แล้วแยกดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 5-10% โพลีอะคริลาไมด์เจล และย้อมด้วย silver stain เพื่อแก้ปัญหา

ข้อจำกัดเรื่องความชัดเจนของเจลอะกาโรส ซึ่งสามารถเก็บเจลไว้ได้ โดยใช้แผ่น polyester films ตัวอย่างการใช้เทคนิคนี้ ได้แก่ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง species และ interspecific crosses ของ bermudagrass (*Cynodon*) (Caetano-Anolles *et al*. , 1995) และการใช้เทคนิค DAF เพื่อประเมินความหลากหลายของคาร์เนชัน (Trigiano and Caetano-Anolles, 1998)

AP-PCR ทำโดย Welsh และ McClelland ในปี ค.ศ.1990 ซึ่งศึกษาใน *Staphylococcus, Streptococcus pyogenes* และในข้าว (*Oryza sativa*) ทั้ง *indica* และ *japonica* โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 20-34 นิวคลีโอไทด์ ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ช่วง คือ ใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing ต่ำใน 2 รอบแรก แล้วจึงเพิ่มให้สูงขึ้นอีก ในการทำ PCR ช่วงหลังจะใส่เอ็นไซม์และนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีลงไปและจะทำ PCR ต่อไปอีก 20-30 รอบ แล้วจึงแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 5% โพลีอะคลิลาไมด์เจลที่มี 50% ยูเรีย ตรวจสอบผลโดยทำออโตเรดิโอกราฟ

วิธี RAPD ของ William ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสคู่สมกันโดยไม่จำเป็นต้องทราบตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอว่าเป็นส่วนใดและของโครโมโซมใด โอกาสที่จะพบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์ คือ 1 ใน 4^{10} โดยประมาณ และถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอโดยเกิดคู่สมได้ 100% แสดงว่านิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีสัดส่วนเท่าๆกันในจีโนม จากการทดลองของนักวิจัยหลายท่านพบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่ได้ขึ้นกับขนาดของจีโนม พืชที่มีจีโนมขนาดใหญ่อาจจะเกิดแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าพืชที่มีจีโนมขนาดเล็กก็ได้ การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน (5'→3') จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้ใน 2 สายที่ห่างไกลกันมากแม้ทิศทางจะเข้าหากันก็ไม่สามารถให้ PCR product ได้ จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR นั้น ในแต่ละครั้งจะขึ้นอยู่กับสิ่งต่างๆเหล่านี้ คือ primer sequence, genomic sequence และ genome size ความแตกต่างของแถบ RAPD หรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละพันธุ์อาจเกิดจาก

1. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

2 .ชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วนที่เป็นตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้ามาเกาะหายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้งสองตำแหน่งทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว

3 .มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณตำแหน่งที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

4.มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไปทำให้ขนาดของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป

อย่างไรก็ตามโพลีมอร์ฟิซึมของ RAPD มักเกิดขึ้นในลักษณะการมีแถบและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชพบทั้งจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรีย ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ RAPD พบว่าแถบดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ 5% เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไมโตคอนเดรีย และน้อยกว่า 5% มาจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ แถบดีเอ็นเอหรือเครื่องหมาย RAPD (RAPD marker) ส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสซึ่งมีการถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่

การเกิดซ้ำของ RAPD (RAPD reproducibility)

ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของเทคนิค RAPD คือ การไม่สามารถให้ผลการทดลองในรูป polymorphism เหมือนเดิมได้ในการทดลองครั้งหลัง ทำให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์หนึ่งๆไม่มีความสม่ำเสมอ(inconsistency) และทำให้มีการทดลองทำการสำรวจหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอแม่แบบและให้ความสม่ำเสมอในการ amplified เช่น ในพืชดอกบางชนิด (Fritsch et al. , 1993) และการหาวิธีที่เป็นมาตรฐานเพื่อป้องกันการไม่เกิดซ้ำของแถบดีเอ็นเอในการทดลองครั้งหลัง (Lowe et al. , 1996) ในเทคนิค DAF ก็ได้มีการหาความสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ ทั้งลำดับเบสและความยาวของไพรเมอร์ การเข้าจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการ annealing (Caetano-Anolles, 1992)

ปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการเกิดแถบที่ไม่สามารถทำซ้ำได้ คือ

1. ความแม่นยำในการควบคุมอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการควบคุมในแต่ละจุด
2. อุณหภูมิที่ตั้งไว้ในช่วงให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing temperature)
3. ระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนการทำ PCR ซึ่งได้แก่ การแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)
4. ความสมดุลย์ระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ
5. ความเข้มข้นของ Mg^{2+}
6. ความเข้มข้น ความบริสุทธิ์ ชนิดและแหล่งที่มาของ *Taq* polymerase

และนอกจากนี้ยังพบว่าปัญหาดังกล่าวอาจเนื่องจากชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดดีเอ็นเอนั้นแตกต่างกันและการสกัดไม่ทำพร้อมๆกันหรืออาจจะมีการปนเปื้อนอื่นๆ ปัจจัยต่างๆทั้งหมดที่กล่าวมานี้ล้วนแล้วแต่มีอิทธิพลต่อรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น

ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิค RAPD มาใช้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดกันอย่างแพร่หลาย เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและ Pathotype ของเชื้อ *Leptoshaeria maculans* (Godwin and Annis, 1991) การศึกษาในข้าวสาลี(Devos and Gale, 1992) การศึกษาในพืชตระกูลกระหล่ำร่วมกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยา และการใช้ไอโซไซม์ (Chaparro *et al*. , 1994) การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Mileham, 1997) การสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) ในยาสูบ (Yu and Lin, 1997) และในข้าวได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้จำแนกสายพันธุ์ (Ko *et al*., 1994, Wang *et al*., 1994, Yu and Nguyen, 1994, Mackill, 1995, Virk *et al*., 1995, Suh *et al*., 1997) รวมถึงการนำเทคนิคนี้มาใช้กับข้าวที่มาจากเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Godwin *et al*., 1997)แต่ในการวิจัยครั้งนี้ได้นำเอาเทคนิคการแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งทำในdenaturing polyacrylamide gel และการย้อมด้วยเงิน (silver stain) มาใช้ร่วมด้วย

จากวิธีทั้งหมดที่ได้กล่าวมานั้น แต่ละวิธีจะมีข้อได้เปรียบและเสียเปรียบแตกต่างกันออกไป การวิจัยครั้งนี้อาศัยจุดเด่นของเทคนิค RAPD อันได้แก่ 1. การใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มเพียงชนิดเดียวโดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน 2.ไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี 3. ราคาต้นทุนต่อหน่วยที่ต่ำกว่าวิธีอื่น 4. ใช้เวลาน้อยและวิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถทำได้หลายๆ sample ไปพร้อมๆกัน 5. ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเพียงปริมาณน้อยก็สามารถวิเคราะห์ได้ 6. เป็นเทคนิคที่สามารถนำไปประยุกต์เพื่อการวิเคราะห์ได้หลายอย่าง เช่น ใช้ในการศึกษาการสร้างลูกผสม (hybridization) การวิเคราะห์ความเป็นพ่อ-แม่ (paternity analysis) การประเมินการผสมข้าม (outcrossing estimation) การประเมินโครงสร้างประชากรในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน (analysis of population structure) การตรวจจับการถ่ายทอดยีน (tracking gene flow) การจำแนกสายพันธุ์ (cultivar identification) การสร้างความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต(phylogenetic reconstruction) การอนุรักษ์ทางชีววิทยา (conservation biology) และการทำแผนที่ยีน (genetic mapping)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

พืชทดลอง

ข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ กข.23 (RD23) พันธุ์หลักใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (Control)

ข้าว กข.23 สายพันธุ์ทนเค็ม ได้แก่ กข23TC7และ กข23TC28 ที่คัดเลือกจาก somaclone ของโครงการ New Varieties of Rice for Saline and Acid Soil through Tissue Culture ของ ศ.มนทกานติ วัชราภัย และคณะ ซึ่งได้ทำการคัดเลือกต่อในรุ่นลูกและหลานอีก 9 ชั่วรุ่นโดย ศ.กิตติคุณ ดร.ถาวร วัชราภัย คุณทิพยวรรณ ธนไพศาล และ คุณวันชัย สังฆ์สุข

อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกข้าวในภาวะเค็มในสารละลาย ได้แก่

กะบะพลาสติกขนาด 20x30x10 เซนติเมตร บรรจุสารละลายได้ 5 ลิตร

แผ่นโฟมหนา 2.5 เซนติเมตร เจาะช่องกลมจำนวน 25 รู กระจายทั่วแผ่นโฟม

ฟองน้ำค้ำจุนต้นกล้าขนาด 1x5x1 เซนติเมตร

เทอร์โมมิเตอร์

อุปกรณ์ปลูกข้าวเพื่อเก็บเมล็ด

กระถางดินเผาไม่มีรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร

ทรายหยาบ

อุปกรณ์และเครื่องมือในการหาเครื่องหมายพันธุกรรม

โกร่ งบดยา

Automatic micropipette P10, P20, P200, P1000 ,Gilson

หม้อนึ่งความดันไอ

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่นU4600P, Sartorious Germany

Incubator รุ่น UM100, Memmert Gmbh , Germany

Microcentrifuge รุ่น Mikro12-24 Hettich Zentrifugen Germany

PCR, รุ่น Hybrid OmniGene, HBTR3CM, Hybaid , UK

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Vertical gel electrophoresis apparatus (16x16 เซนติเมตร)ATTO,Japan พร้อม Power supply, รุ่น Power PAC 300, Bio-Rad Laboratories, USA Spectrophotometer, รุ่น GENESYS 5, Milton Roy, USA

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการปลูกข้าวในภาวะเค็มและการบำรุงรักษาเพื่อเก็บเมล็ด

Sodium chloride (NaCl) องค์การเภสัชกรรม

สารเคมีสำหรับเตรียมปุ๋ย WP No.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya,1991)ภาคผนวก ก)

สารเคมีกำจัดโรคและแมลง ในเรือนปลูกข้าว

สารเคมีกำจัดเพลี้ย. แอดมาย (Admire)

สารเคมีกำจัดโรคใบไหม้ แคงเคอร์–เอ็กซ์ (Kanker-x)

สารเคมีที่ใช้ในการหาเครื่องหมายพันธุกรรม (molecular grade)

Acrylamide (CH_2=$CHCONH_2$), USB, American International Plc., England

Ammonium persulfate ($(NH_4)_2S_2O_8$), USB, American International Plc., England

100 base pair(bp) DNA ladder(ประกอบด้วย15 fragments ได้แก่ 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1300, 1400 และ 1500bp) ความเข้มข้น250μg/ml ซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8.0 1 μg/μl., Gibco BRL

Boric acid (H_3BO_3, MW 61.38 g/mol), Farmitalia Carbo Erba, Milano, Italy.

Bromophenol blue, Merck, Germany

Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB, MW 364.46 g/mol), Merck, Germany

Chloroform ($CHCl_3$, MW 119.38 g/mol), Merck, Germany

Citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7.H_2O$, F.W.210.14), J.T. Baker Chemicals B.V., Deventer, Holland

Disodium ethylenediametetraacetic acid-2-hydrate

($Na_2EDTA.H_2O$, MW 372.24 g/mol), Fluka Chemica, Biochemica, Switzerland

Ethanol absolute (C_2H_5OH, MW 46.07 g/mol), Merck, Gernany

Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), Fluka chemica, Biochemica, Switzerland.

Formaldehyde 40% m/v (HCHO, M 30.026), Farmitalia Carlo Erba, Milano, Italy.

Formamide ($HCONH_2$, M 45.04 g/mol), Merck, Germany.

Gene Amp. PCR core reagent ,Perkin Elmer Cetus, USA.

: 10x Taq DNA polymerase storage buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0 at 25°C, 500 mM KCl, 1% Triton X- 100, Magnesium-free), Promega Co., USA.

: 10 mM dNTPs nucleotide mixes (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Promega Co., USA.

: *Taq* DNA polymerase (5 U/μl), Promega Co., USA.

: Magnesium chloride (25 mM), Promega Co., USA.

Glycerol ($CH_2OH.CHOH.CH_2OH$, MW 92.10 g/mol), BDH Chemicals Ltd., England.

Hydrochloric acid (HCl 37%, MW 36.46 g/mol), May and Baker Laboratory Chemicals, England.

8-Hydroxy-quinoline (8-hydroxy-1-azanopthalene, C_9H_7NO, FW 145.2), Sigma Chemical Company, USA.

Iso-amyl alcohol ($C_5H_{11}OH$, MW 88.151 g/mol) Merck, Gernany

β-Mercaptoethanol (C_2H_6OS, FW 78.13), Sigma Chemical Company, USA.

Mineral oil, Aldrich Chemical Company, Inc., Germany.

Methyl alcohol (CH_3OH, MW 32.042), Farmitalia Carlo Erba, Milano, Italy.

N,N'-Methylene-Bis-Acrylamide($CH_2=CHCO(NH)_2CH_2$) USB, American International plc., England.

Nitric acid (HNO_3, 70%), Farmitalia Carlo Erba, Milano, Italy.

Phenol crystal (C_6H_5OH), Merck, Germany.

Polyvinyl pyrolidone (PVP type 360) Sigma Chemical Company, USA.

Silver nitrate ($AgNO_3$, MW 169.87 g/mol), BDH Laboratory, England.

Sodium acetate (CH_3COONa, FW 136.08), Farmitalia Carlo Erba, Milano, Italy.

Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3, MW 105.99 g/mol), Fluka Chemica Biochemica, Switzerland.

Sodium chloride (NaCl, MW 58.44 g/mol), BDH Chemicals Ltd., England.

Sodium dodecyl sulfate (SDS, FW 288.38),USB, United States Biochemical.

Sodium hydroxide pellet (NaOH, MW 40 g/mol), Merck, Germany.

Tris –Hydoxymethyl-aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$, FW 121.1), Serva, Feinbiochemica GmbH & Co., France.

TEMED ($C_6CH_{16}N_2$, FW 116.21), USB American International Co., England.Urea (CH_4N_2O, MW 60.06 g/mol), Merck, Germany.

Xylene Cyanol FF, Sigma Chemical Company, USA.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไพรเมอร์

UBC primer

(University of British Columbia Biotechnology Laboratory)

UBC228	มีลำดับเบส 5'→3'	GCTGGGCCGA
UBC456	"----------"	GCGGAGGTCC
UBC457	"----------"	CGACGCCCTG
UBC459	"----------"	GCGTCGAGGGG

CU primer

(ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

CU1	มีลำดับเบส 5'→3'	GTTTCGCTCC
CU2	"----------"	CCACAGCAGT
CU3	"----------"	AGTGCAGCCA
CU4	"----------"	AACGGCGACA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1.ทดสอบความอยู่รอดของสายพันธุ์ทนเค็ม

เพาะเมล็ดข้าวให้ได้กล้าระยะ 3 ใบ ย้ายมาปลูกในกะบะพลาสติกที่มีแผ่นโฟมเจาะรูลอยอยู่ในน้ำปุ๋ย ยึดต้นกล้ากับแผ่นโฟมด้วยฟองน้ำ เลี้ยงจนได้ระยะ 5 ใบทำการทดสอบความอยู่รอดของข้าวทนเค็มสายพันธุ์ กข23TC7 กข23TC28 เปรียบเทียบกับกข23 สายพันธุ์หลักโดยการนำต้นกล้าระยะ 5 ใบ อายุประมาณ17วัน ปลูกในสารละลายปุ๋ย WP No.2ที่เติม NaCl 0.3% วัดค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง 6-7 mmho/cm ที่ 28 องศาเซลเซียส โดยให้กล้าข้าวสัมผัสกับความเค็มเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในโรงเรือนปลูกข้าวที่มีหลังคาพลาสติกคลุมอยู่ เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ย้ายกล้าข้าวมาปลูกในน้ำประปาต่ออีก 1 สัปดาห์ และนับจำนวนต้นที่รอด เพื่อหาอัตราการรอดตาย โดยมีต้นกล้ากะบะละ 25 ต้น รวม 3 กะบะ

2.เปรียบเทียบหาวัสดุทดลอง(เนื้อเยื่อพืช)ที่เหมาะสมต่อการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบระหว่างแคลลัสที่ชักนำจากเอ็มบริโอของข้าวและต้นกล้าข้าวที่เพาะโดยวิธีปกติ

ในขั้นตอนการคัดเลือกวัสดุทดลองที่เหมาะสม เพื่อวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรมจำเป็นต้องเลือกชิ้นส่วนที่เหมาะสม ซึ่งในการทดลองจะทำการศึกษาเปรียบเทียบชิ้นส่วนที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบจากเนื้อเยื่อ 2 ชนิด ได้แก่ชิ้นส่วนของแคลลัสที่ได้จากเอ็มบริโอของข้าวและชิ้นส่วนต้นกล้า โดยอาศัยข้อดีของแต่ละชิ้นส่วน คือ ชิ้นส่วนของแคลลัสได้จากชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเกลือ NaCl เพื่อให้ได้แคลลัสที่เจริญเติบโตได้ในสภาพเค็ม แคลลัสดังกล่าวจะเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีความสามารถในการแสดงออก และเป็นกลุ่มเซลล์อ่อนที่มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีCTABที่นิยมใช้ ขณะที่ชิ้นส่วนของต้นกล้าอาศัยข้อเด่นในการหลีกเลี่ยงอิทธิพลจากการเกิด somaclonal variation

2.1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าว กข23 เนื่องจากข้าว กข23 เป็นสายพันธุ์ที่ชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอได้ค่อนข้างยากเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิหรือเหลืองประทิว (มนทกานติ วัชราภัย, ติดต่อเป็นการส่วนตัว) การทดลองนี้ใช้เอ็มบริโอของข้าวกข23สายพันธุ์หลักที่เจริญเต็มที่โดยการนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ 5 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันในชนิดและปริมาณสารอาหาร ซึ่งได้แก่สูตร A CU M-019 SK-1 และ Y (ภาคผนวก ง)

สูตร A เป็นสูตรชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าว จากสุดารัตน์ นิติวัฒนะ (2538)

สูตร CU เป็นสูตรชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าว จากหน่วยปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (มนทกานติ วัชราภัย,ติดต่อเป็นการส่วนตัว)

สูตร M-019 เป็นสูตรชักนำแคลลัสจากอับเรณูข้าว จาก Raina (1993)

สูตร SK-1 เป็นสูตรที่ใช้เลี้ยงข้าว *Indica* ที่ได้ผลดี จาก Raina และคณะ (1989)

สูตร Y เป็นสูตรชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าว จาก Yamada และ Okada (1991)

นำเมล็ดข้าว กข23 สายพันธุ์หลักที่เป็น breeder seed แกะเปลือกออก ล้างเมล็ดให้สะอาด และฆ่าเชื้อที่ผิวในสารละลายคลอรอกซ์ 25% นาน 30 นาทีและ 10% นาน 5 นาที ตามลำดับ ล้างให้หมดน้ำยาฆ่าเชื้อด้วยน้ำกรองปลอดเชื้ออีก 3 ครั้ง นำมาเลี้ยงในขวดที่บรรจุอาหารทั้ง 5 สูตร โดยใช้ขวด Vial ขนาด 35 ml ซึ่งบรรจุอาหารขวดละ 15 ml โดยเลี้ยงขวดละ 1 เอ็มบริโอ (เมล็ด) นำขวดไปตั้งบนชั้นมืด อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ศึกษาผลของสูตรอาหารโดยการชั่งน้ำหนักและสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสที่ชักนำได้

2.2 การเลือกระดับของ NaCl ที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ทนเค็ม

ผลการทดลองในข้อ 2.1 เมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าวกข23แล้ว นำมาเป็นสูตรอาหารที่เติม NaCl 0.3 และ 0.5% เพื่อทำการคัดเลือกระดับของ NaCl ที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ทนเค็ม โดยใช้แคลลัสที่อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเท่าๆกัน และเป็นแคลลัสที่มีลักษณะเป็น embryogenic callus (E-callus) นำมาเลี้ยงในอาหารที่เติม NaCl ดังกล่าว โดยใช้อาหารขวดละ 15 ml เลี้ยงแคลลัสขวดละ 1 ชิ้น ตั้งบนชั้นมืดที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลองเมื่อเลี้ยงแคลลัสแล้ว 2 สัปดาห์

2.3 การเตรียมแคลลัสทนเค็มเพื่อนำมาวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

เลี้ยงแคลลัสข้าวกข23สายพันธุ์ทนเค็มทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารสูตรที่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าว(จากข้อ 2.1) เป็นเวลา 3 สัปดาห์แล้วนำแคลลัสที่ได้ย้ายลงในสูตรอาหารที่เติมเกลือ NaCl โดยเลือกใช้ NaCl 0.5% เติมลงในอาหารเลี้ยงแคลลัส(ผลการทดลองในข้อ 2.2) ตั้งบนชั้นมืดที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

2.4 การเพาะกล้าข้าวเพื่อใช้เป็นวัสดุทดลอง

ในการทดลองเพื่อหลีกเลี่ยงโอกาสที่จะเกิด somaclonal variation จึงเลือกเปรียบเทียบวัสดุทดลองที่เป็นต้นกล้า ในการเพาะวัสดุทดลองที่เป็นต้นกล้าสามารถปฏิบัติได้ดังนี้

2.4.1 ทำการคัดเลือกเมล็ดที่สะอาด สมบูรณ์ เมล็ดไม่แตกหัก และสุ่มเลือกเมล็ดสายพันธุ์ละ 40 เมล็ด

2.4.2 นำเมล็ดมาแช่น้ำที่อุณหภูมิ 50°C แล้วปล่อยให้อุณหภูมิลดลงจนถึงอุณหภูมิห้องโดยแช่เมล็ดเป็นเวลา 1 วัน

2.4.3 เพาะเมล็ดที่ได้ในข้อ 2.4.2 ลงบนกระดาษเพาะที่ชุ่มน้ำบนจานแก้ว แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าต้นกล้าจะเจริญเติบโตจนมีความยาว3-5 เซนติเมตร จึงนำกล้าที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อทำการทดลองในขั้น ต่อไป

3.การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช

สกัดดีเอ็นเอรวมจากตัวอย่างพืชที่ได้ โดยหลักการตกตะกอนโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดใหญ่ก่อน แล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไปด้วย cetyltrimethyl ammonium bromide หรือ CTAB ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) ซึ่งขั้นตอนเป็นดังต่อไปนี้

1) บดตัวอย่างพืชโดยใช้อัตราส่วนแคลลัส 150 mg หรือต้นข้าวส่วนที่เป็นลำต้น 50 mg ใน 2% CTAB 500 μl นำตัวอย่างที่บดไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 นาที

2) เติม chloroform isoamylalcohol (24:1) 500 μl เขย่าให้เข้ากันนาน 10 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3) แยกเอาเฉพาะส่วนใสข้างบน มาตกตะกอนต่อภายหลังการเติม 10% CTAB โดยใช้ 10% CTAB 1 ส่วนต่อส่วนใส 10 ส่วน เขย่าให้ละลายเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และนำไปปั่นแยกด้วยความเร็วรอบ 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

4) เก็บส่วนตะกอน แล้วนำมาละลายในสารละลาย NaCl-TE ปริมาตร 500 μl ตกตะกอนต่อหลังจากการเติม iso-propanol 500 μl เขย่าให้เข้ากันแล้วปั่นที่ความเร็วรอบ 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

5) นำตะกอนมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 800 μl ปั่นให้ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

6) ตากตะกอนที่ได้ให้แห้งด้วย vacuum desiccator และนำตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 20-50 μl

7) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 280 และ 320 nm. เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณ และความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้ เก็บรักษาที่ -20°C เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.การทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอแม่แบบด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

การคัดเลือกดีเอ็นเอจากตัวอย่างมีส่วนไปเกี่ยวกับคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ กล่าวคือ ดีเอ็นเอต้องมีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ต้องมีความบริสุทธิ์มากพอ ปราศจากinhibitorต่างๆ ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องมีปริมาณมากพอในการวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอในลักษณะที่กล่าวสามารถตรวจสอบได้จากความสามารถในการเพิ่มปริมาณด้วยเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้งแคลลัสและจากต้นกล้า โดยเลือกใช้ primer ที่มีการเรียงลำดับดีเอ็นเออย่างสุ่ม(Random primer) รหัส UBC457 โดยใช้ดีเอ็นเอ ตัวอย่าง 25 ng. ในปฏิกิริยา 20 μl ประกอบไปด้วย 25mM TrisHCl pH 8.0 500mM KCl 2mM $MgCl_2$ 1mM β-mercaptoethanol 200 μM each of dNTP Template 0.2 μM UBC457 primer และ 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

Denature	94°C	15 วินาที (จำนวน 35 รอบ)
Annealing	36°C	45 วินาที (จำนวน 35 รอบ)
Extension	72°C	90 วินาที (จำนวน 35 รอบ)

วิเคราะห์ความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก PCR product ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 8% polyacrylamide gel ย้อมด้วยโลหะเงิน (silver staining)

5. การคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับความสามารถในการทนเค็ม

การตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับความสามารถในการทนเค็ม ทำได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยไพรเมอร์แต่ละชนิดอย่างสุ่ม เพื่อเปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอจากข้าวกข23สายพันธุ์หลักซึ่งเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบและข้าวกข23สายพันธุ์ทนเค็มทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้กับลักษณะของความสามารถในการทนเค็ม

ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความสม่ำเสมอของผลการทดลองจากการทำซ้ำได้ (reproducibility) ด้วยเทคนิค DAF โดยใช้ไพรเมอร์ UBC228 UBC456 UBC457 และ primer CU1-CU4

5.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งในข้าว กข23สายพันธุ์หลัก และสายพันธุ์ทนเค็ม กข 23TC7 , กข23TC28 ด้วยไพรเมอร์แต่ละชนิด ในกรณีของ UBC primer โดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่าง 25

ng. ในปฏิกิริยา 20 μl ดังระบุในข้อ 4 วิเคราะห์ตัวอย่าง PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ใช้ UBC primer บน polyacrylamide gel ที่ย้อมด้วยโลหะเงิน ในกรณีของ CU primer ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ 25 ng. ในปฏิกิริยา 20 μl โดยนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

Denature	94°C	1 นาที (จำนวน 45 รอบ)
Annealing	36°C	1 นาที (จำนวน 45 รอบ)
Extension	72°C	2 นาที (จำนวน 45 รอบ)

วิเคราะห์ตัวอย่าง PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ใช้ CU primer ด้วยการแยกขนาดดีเอ็นเอบน 1.5%agarose gel ย้อมด้วย Ethydium bromide และส่องดูด้วยแสง UV

5.2.การทำ electrophoresis บน polyacrylamide gel (polyacrylamide gel electrophoresis:PAGE)

การทดลองใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น %T=8% %C=5 โดยใช้ 0.5xTBE เป็นบัฟเฟอร์ ตามวิธีที่ของ Sambrook (1989) โดยนำ 10% ของ DNA products ที่ได้ของแต่ละปฏิกิริยามาผสมกับ 10xTBE และสาร formamide ในสัดส่วน 1:1:8 แล้วแยกขนาดโมเลกุลเปรียบเทียบกับโมเลกุลมาตรฐาน 100 base pair ladder (Gibco BRL USA) ด้วยสนามไฟฟ้าคงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5.3 การย้อมเจลด้วยโลหะเงิน (silver staining)

ย้อมเจลด้วยโลหะเงินตามวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Berry and Samuel (1982) และ De Moreno, Smith and Smoth (1985) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ภายหลังการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลมาแช่ย่าล้างในสารละลาย 40% methanol เป็นเวลา 10 นาที และน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาทีตามลำดับ

2) นำแผ่นเจลมาทำปฏิกิริยาขั้นต้นกับสารละลาย 160mM HNO_3 5 นาที และแช่ย่าล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที ก่อนทำปฏิกิริยาต่อไป

3) นำแผ่นเจลที่ได้ในข้อ 2 มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย $AgNO_3$0.2% เป็นเวลา 20 นาที แล้วแช่ย่าล้างด้วยน้ำกลั่น 3 นาที

4) ทำให้ปฏิกิริยาภายในเจลเสถียรโดยตรึงเจลด้วยการแช่สารละลาย $Na_2CO_3$3% ที่มีความเข้มข้นของ formaldehyde 40%

5) ทำปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายด้วยสารละลาย 0.1M citric acid เป็นเวลา 5 นาที เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนแล้ว นำแผ่นเจลมาทำให้แห้งบนแผ่นเซโลเฟน โดยขึงเจลบนแผ่นเซโลเฟนที่ชุ่มด้วยน้ำ ตากให้แห้งที่อุณหภูมิ25$\pm$2 องศาเซลเซียส บันทึกภาพผลการทดลอง

6. การสร้างข้าวลูกผสมเพื่อศึกษาการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในรุ่นลูก

ทดสอบการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล โดยการศึกษาการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ได้กับดีเอ็นเอจากรุ่นลูก ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

6.1 การผสมพันธุ์ข้าวแบบสลับพ่อแม่ (reciplocal cross) โดยเทคนิค clip method

ผสมพันธุ์ข้าวสลับพ่อแม่ระหว่างข้าว กข23 สายพันธุ์ทนเค็ม 2 สายพันธุ์ (กข23TC7 , กข 23TC28) กับbreeder seed ของ กข23สายพันธุ์ปกติ ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบที่ไม่ทนเค็ม ทำให้ได้ลูกผสมทั้ง 4 cross ซึ่งได้แก่

กข23 สายพันธุ์หลัก x กข23TC7
กข23 สายพันธุ์หลัก x กข23TC28
กข23TC7 x กข23 สายพันธุ์หลัก
กข23TC28 x กข23 สายพันธุ์หลัก

จากการศึกษาพบว่า ข้าวเป็นพืชผสมตัวเอง โดยดอกข้าวจะบานจากปลายรวงเข้าสู่โคนรวง ซึ่งใน 1 รวงจะใช้ระยะเวลาในการบานประมาณ 1 สัปดาห์ และจะบานในตอนเช้าเวลาประมาณ 7.30–12.00น. ส่วนละอองเรณูจะหล่นก่อนหรือพร้อมกันกับการบานของดอก ดังนั้นในการผสมเกสรจะต้องกำจัดเกสรตัวผู้ (emasculation) ก่อนช่วงเวลาที่ดอกข้าวจะบานเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการผสมตัวเอง

6.1.1 การกำจัดเกสรตัวผู้ (emasculation)

ทำในช่วงบ่ายก่อนการผสมเกสรในวันรุ่งขึ้น โดยเลือกใช้รวงของต้นแม่ที่แข็งแรงที่มีช่อดอกโผล่พ้นใบธงประมาณ 60% ตัดแต่งช่อดอกให้เหลือดอกติดช่อดอกตัดดอกไว้ประมาณ 20 ดอก/รวง โดยตัดดอกที่แก่และอ่อนมากเกินไปทิ้ง ซึ่งดอกที่เก็บไว้เป็นดอกที่จะบานในวันรุ่งขึ้นและพร้อมที่จะผสม ใช้กรรไกรปลายงอนตัดปลายกลีบดอก (lemma และ palea) ออกหนึ่งในสามของ

ดอก แล้วใช้ปากคีบดึงเอาอับละอองเรณูทั้ง 6 อันทิ้งให้หมด ทำให้ครบทุกดอก จากนั้นจึงคลุมช่อดอกด้วยถุงกระดาษที่ใช้สำหรับผสมเกสรข้าวโดยเฉพาะ ปิดปากถุงกระดาษโดยใช้คลิบหนีบกระดาษ แล้วติดป้ายไว้ทุกช่อดอกที่ทำ

6.1.2 การผสมเกสร

ทำในช่วงเช้าของวันรุ่งขึ้นตั้งแต่เวลา 7.30-12.00น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ยอดเกสรตัวเมียพร้อมรับการผสม และอับละอองเรณูเริ่มแตกโดยนำอับละอองเรณูของดอกที่เพิ่งเริ่มบาน และยังมีละอองเรณูอัดแน่นอยู่ (ซึ่งสังเกตได้จากสีของอับละอองเรณูจะมีสีเหลืองเข้ม) จากต้นพ่อ 1 อับละอองเรณูไปใส่ใน 1 ดอกของต้นแม่ที่ได้ทำ emasculate ไว้แล้ว ทำจนครบทุกดอกเสร็จแล้วใช้ถุงคลุมช่องดอกไว้ตามเดิมพร้อมทั้งเขียนคู่ผสมและวันที่ทำการผสมลงในป้ายที่ติดไว้ประจำช่อดอกแต่ละช่อ

6.1.3 เก็บเมล็ด

เกี่ยวรวงที่แก่จัด (หลังการผสม 25-30 วัน) นำไปอบเพื่อลดความชื้นและทำลายการฟักตัวที่อุณหภูมิ 48$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เก็บเมล็ดในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการทดลองที่โรงเรือนปลูกข้าว ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. การเพาะเมล็ดข้าวลูกผสมและการสกัดดีเอ็นเอ

ขั้นตอนการเพาะเมล็ดข้าวลูกผสมดำเนินการตามที่ระบุไว้ในตอนต้นโดยเพิ่มขั้นตอนการตรวจตราและคัดแยกเมล็ดที่ปนเปื้อนจากเชื้อรา ขณะทำการเพาะออกทิ้งอย่างสม่ำเสมอ เมื่อต้นกล้ามีขนาดยาว 3-5 เซนติเมตร ตัดชิ้นส่วนต้นทั้งหมดไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB

8. การวิเคราะห์การกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในข้าวลูกผสม

วิเคราะห์การกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวลูกผสมในแต่ละสายพันธุ์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่ด้วย primerกลุ่ม UBC และกลุ่ม CU แล้วนำไปวิเคราะห์โดยการแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส บันทึกภาพและการตรวจ

สอบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่จะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ในการตรวจสอบความสามารถของการทนเค็มในข้าวตามวิธีที่ได้รายงานไว้ในตอนต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบความอยู่รอดของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม

เมื่อนำกล้าข้าวระยะ 5 ใบ อายุประมาณ 17 วัน มาปลูกในสารละลายปุ๋ย WP.No.2ที่เติม NaCl 0.3 % มีค่าการนำกระแสไฟฟ้า 6-7 mmho/cm. พบว่าในสัปดาห์แรกต้นกล้าทั้ง 3 พันธุ์ยังไม่แสดงอาการตอบสนองต่อ NaCl แต่ในสัปดาห์ที่ 2 สายพันธุ์หลักที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบเริ่มแสดงอาการของพิษของ NaCl โดยใบล่างเริ่มแห้งส่วนใบบนมีอาการเหลืองซีด ในขณะที่กล้าของสายพันธุ์ทนเค็มมีอาการปกติ

สัปดาห์ที่ 3 สายพันธุ์หลักเห็นอาการใบแห้งตายชัดเจน ในใบแก่และส่วนยอดเริ่มเหี่ยวและฟุบตัว ซึ่งในเวลาเดียวกันนี้สายพันธุ์ทนเค็มเริ่มมีอาการแห้งของใบแก่และเริ่มเห็นอาการเหลืองซีดของใบบน

สัปดาห์ที่ 4 พบว่าข้าวสายพันธุ์หลักตายเป็นส่วนใหญ่ ส่วนสายพันธุ์ทนเค็มเริ่มมีอาการเหี่ยวเฉา ใบล่างแห้งตาย ใบยอดมีอาการเหลืองซีด และฟุบตัว นับอัตราการรอดตายโดยย้ายกล้าข้าวทั้งหมด 75 ต้นมาปลูกต่อในน้ำประปาเป็นเวลาอีก 1 สัปดาห์จึงบันทึกอัตราการรอดตายโดยดูจากต้นที่มีใบใหม่เจริญต่อได้ดี เป็นต้นที่รอดตาย ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กข23TC7 มีอัตราการรอดตายเป็น 86.3% กข23TC28 มีอัตราการรอดตายเป็น 69.5% โดยสายพันธุ์หลักมีอัตราการรอดตายเพียง 57.6%

ตารางที่1 อัตราการรอดตายของข้าวเมื่ออยู่ในสารละลายปุ๋ยสูตร WP No.2 ที่เติมเกลือ NaCl 0.3% เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ทุกการทดลองใช้ซ้ำละ 25 ต้น)

ซ้ำที่	กข23สายพันธุ์หลัก (%)	กข23TC7 (%)	กข23TC28 (%)
1	58.0	84.0	81.0
2	66.7	91.7	66. 7
3	48.0	83.3	60.9
เฉลี่ย	57.6±9.4	86.3±4.7	69.5±14.2

2. เปรียบเทียบหาวัสดุทดลองที่เหมาะสมต่อการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบระหว่างแคลลัสที่เลี้ยงจากเอ็มบริโอของข้าวและต้นกล้าข้าวที่เพาะโดยวิธีปกติ

2.1 ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าวกข23

เมื่อศึกษาผลของสูตรอาหารที่เหมาะต่อการชักนำแคลลัส ได้ผลดังตารางที่ 2-4 คือ อาหารสูตร A นับว่าเป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดเพราะนอกจากจะได้แคลลัสที่มีน้ำหนักดีที่สุดแล้ว ยังได้แคลลัสที่มีลักษณะเป็น embryogenic callus(E-callus)เป็นส่วนใหญ่ ซึ่ง E-callus นี้เมื่อนำไปเลี้ยงต่อเพื่อชักนำให้เกิดต้นจะเป็นแคลลัสที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาให้เป็นต้นได้ดีที่สุด ส่วนสูตร M-019 แม้จะได้แคลลัสที่เป็น E-callus คล้ายสูตร A แต่ปริมาณแคลลัสได้น้อยกว่า

ตารางที่ 2 น้ำหนักสดของแคลลัส(กรัม) เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร A CU M-019 SK-1 และ Y เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ตัวอย่างที่	น้ำหนักแคลลัสต่อ 1 เอ็มบริโอ (กรัม)				
	A	CU	M-019	SK-1	Y
1	0.0669	0.0224	0.0978	0.0503	0.0413
2	0.5800	0.0858	0.1037	0.0624	0.0455
3	0.1814	0.0685	0.0647	0.1010	0.0616
4	0.1426	0.0864	0.1006	0.0520	0.0543
5	0.1587	0.0784	0.0493	0.0283	0.0118
6	0.2712	0.0275	0.1692	0.0565	0.0041
7	0.1451	0.0087	0.1121	0.0165	0.0395
8	0.0766	0.0112	0.1549	0.1084	0.1127
9	0.2500	0.0645	0.0734	0.0572	0.0909
10	0.3163	0.0768	0.2664	0.0601	0.1235
11	0.2528	0.0643	0.0525	0.0367	0.0595
12	0.1455	0.0488	0.0202	0.0367	0.0434
13	0.1968	0.0925	0.0644	0.1911	0.0286
14	0.2275	0.0307	0.0538	0.0504	0.0389
15	0.1913	0.0527	0.0648	0.0470	0.0606
16	0.1800	0.0593	0.1578	0.0409	0.0851
17	0.2384	0.0341	0.0289	0.0445	0.0777
18	0.1984	0.0614	0.1547	0.1565	0.0981
19	0.1957	0.0159	0.1484	0.0766	0.0624

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2(ต่อ) น้ำหนักสดของแคลลัส(กรัม) เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร A CU M-019 SK-1 และ Y เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ตัวอย่างที่	น้ำหนักแคลลัสต่อ 1 เอ็มบริโอ (กรัม)				
	A	CU	M-019	SK-1	Y
20	0.1623	0.0269	0.1633	0.0758	0.1149
21	0.3052	0.0314	0.1573	0.0351	0.0682
22	0.2446	0.0593	0.0510	0.0275	0.0454
23	0.1940	0.0425	0.1059	0.0551	0.0524
24	0.2126	0.0127	0.1188	0.0446	0.0227
25	0.1924	0.0615	0.1776	0.0736	0.0647
26	0.1545	0.0247	0.1459	0.0587	0.0448
27	0.2726	0.0061	0.1028	0.0699	0.0286
28	0.3502	0.0202	0.0762	0.0542	0.0320
29	0.3169	0.0896	0.0590	0.0157	0.0224
30	0.1958	0.0225	0.1335	0.0333	0.0380
31	0.3131	0.0429	0.0594	0.0878	0.0764
32	0.1213	0.0636	0.1849	0.0947	0.0312
33	0.1232	0.0069	0.0975	0.0541	0.0236
34	0.2227	0.0064	0.1204	0.0513	0.0244
35	0.0915	0.0023	0.0410	0.0687	0.1407
36	0.0343	0.0971	0.0838	0.0709	0.0241
37	0.1751	0.0220	0.1793	0.0371	0.0121
38	0.2000	0.0532	0.1351	0.0445	0.0137
39	0.4543	0.0575	0.1836	0.0856	0.0918
40	0.4147	0.0561	0.1989	0.0257	0.0652
41	0.4593	0.0492	0.1703	0.1309	0.0586
42	0.1706	0.0393	0.2613	0.0745	0.0782
43	0.3799	0.0497	0.1808	0.0560	0.0737
44	0.1962	0.0032	0.1838	0.1432	0.0962
45	0.3074	0.0588	0.0718	0.0655	0.0408
46	0.1007	0.0976	0.1433	0.0643	0.1062
47	0.1736	0.0492	0.1787	0.0564	0.0175
48	0.2435	0.0304	0.0580	0.0575	0.0945

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2(ต่อ) น้ำหนักสดของแคลลัส(กรัม) เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร A CU M-019 SK-1 และ Y เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ตัวอย่างที่	น้ำหนักแคลลัสต่อ 1 เอ็มบริโอ (กรัม)				
	A	CU	M-019	SK-1	Y
49	0.3010	0.0643	0.1070	0.0616	0.0481
50	0.4424	0.0379	0.0976	0.0460	0.0839
51	0.2253	0.0391	0.0738	0.1140	0.0116
52	0.0675	0.0509	0.0841	0.0705	0.0510
53	0.0937	0.0421	0.1210	0.0891	0.0802
54	0.0431	0.0420	0.1238	0.0853	0.0652
55	0.3154	0.0835	0.1013	0.0730	0.0519
56	0.1688	0.0302	0.1460	0.0322	0.0283
57	0.1298	0.0053	0.1872	0.0390	0.0269
58	0.1654	0.0332	0.0797	0.0129	0.0861
59	0.1591	0.0396	0.1876	0.0597	0.0029
60	0.2510	0.0159	0.1519	0.0908	0.0533
61	0.3698	0.0431	0.1920	0.0451	0.1223
62	0.3679	0.0493	0.1481	0.0804	0.0264
63	0.5213	0.0579	0.0283	0.0401	0.0841
64	0.1793	0.0300	0.1138	0.0286	0.0558
65	0.3317	0.0639	0.2085	0.0766	0.0410
66	0.1755	0.0102	0.1459	0.1041	0.0268
67	0.2391	0.0910	0.1147	0.0654	0.0494
68	0.1966	0.0747	0.1208	0.0280	0.1009
69	0.2672	0.0445	0.0457	0.0314	0.0843
70	0.2944	0.0447	0.0841	0.0371	0.0291
71	0.3108	0.0282	0.2189	0.0557	0.0749
72	0.3351	0.0373	0.1029	0.0528	0.05377
เฉลี่ย	0.2355±0.1100	0.0449±0.0252	0.1215±0.0555	0.0718±0.0322	0.0567±0.0316

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัส

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT (T)	4	1.75296	0.43824	94.33**
ERROR	355	1.64927 0.00465		
TOTAL	359	3.40223		
CV = 64.3%		** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 1%		

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดต่อแคลลัสและลักษณะแคลลัส

สูตรอาหาร	หนักสดแคลลัส(กรัม)ต่อ 1 เอ็มบริโอ	ลักษณะของแคลลัส
A	0.2355 d	E-callus แคลลัสมีสีครีมเข้ม
CU	0.0449 a	E-callus+NE-callus ในอัตราส่วนที่เท่าๆกัน แคลลัสมีสีครีมเข้ม
M-019	0.1215 c	E-callus แคลลัสมีสีครีมเข้ม
SK-1	0.0718 b	พบ NE-callusมากกว่า E-callus แคลลัสมีสีครีมเข้ม
Y	0.0567 ab	E-callus แต่ แคลลัสมีสีเหลืองเข้ม

น้ำหนักสดของแคลลัสที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple rank test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลองที่ได้ในตารางที่ 2-4 สูตรอาหาร A ให้น้ำหนักแคลลัสดีที่สุด โดยแคลลัสที่ได้เกิดจากเซลล์ขนาดเล็กที่มีการเกาะตัวกันแน่น (compact callus) แต่ละเซลล์มีลักษณะกลม ขนาดสม่ำเสมอ แคลลัสมีสีครีมเข้ม ซึ่งเป็นดัชนีอันหนึ่งที่ชี้บอกความสามารถที่ดีในการเลี้ยงของแคลลัส โดยสูตร A ให้น้ำหนักเฉลี่ย 0.2355 กรัม สูตรอาหารที่ให้น้ำหนักของแคลลัสรองลงมาคือ

สูตร M-019 ให้เซลล์ที่มีส่วนคล้ายคลึงกับสูตร A แต่มีปริมาณแคลลัสน้อยกว่า ปริมาณแคลลัสเฉลี่ยเป็น 0.1215 กรัม สูตรอาหาร CW SK-1 และ Y ชักนำให้เกิดแคลลัสในปริมาณที่น้อยกว่ามาก โดยสูตรอาหาร SK-1 ให้ปริมาณแคลลัสใกล้เคียงกับสูตรอาหาร Y โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยของทั้ง 3 สูตรเป็น 0.0449 0.0718 และ 0.0567 กรัม ตามลำดับ แคลลัสที่ได้จากสูตร SK-1 มีการเกาะตัวของเซลล์อย่างหลวมๆ แคลลัสใส สีอ่อนกว่ามาก ขณะที่สูตร Y เซลล์แคลลัสสีคล้ำและเซลล์เกาะตัวกันแน่น บางเซลล์มีลักษณะสีน้ำตาลและแห้ง จากการวิเคราะห์ทางสถิติประกอบ พบว่า อาหารสูตร A ให้ผลในการชักนำแคลลัสดีที่สุดจากสูตรอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ

2.2. ผลการเลือกระดับของ NaCl ที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ทนเค็ม

เมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร A ที่เติม NaCl 0.3และ0.5% เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยสังเกตจากการทดลองละ 10 แคลลัส

พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงใน NaCl 0.5% ในสัปดาห์ที่ 2 แคลลัสของสายพันธุ์หลักซึ่งไม่ทนเค็มมีลักษณะเซลล์รอบนอกของแคลลัสเริ่มจากเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและลุกลามเข้าไปจนกลายเป็นสีดำทั้งก้อน

ส่วนแคลลัสที่ทนเค็มในสัปดาห์ที่ 2 พบว่ามีแคลลัสบางก้อนที่มีอาการเหมือนกับแคลลัสที่ไม่ทนเค็ม แต่ส่วนใหญ่จะแสดงอาการพิษของNaCl เฉพาะเซลล์บริเวณรอบนอกของแคลลัสเท่านั้นที่เปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาล ส่วนเซลล์ด้านในของเซลล์ยังมีอาการปกติอยู่

โดยแคลลัสเหล่านี้แสดงอาการให้เห็นชัดในอาหารที่เติม NaCl 0.5% ซึ่งพบว่าสายพันธุ์หลักมีการตายเกิน 50% เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 2 ในขณะที่สายพันธุ์มทนเค็ม คือ กข23TC7 และ กข23TC28 มีการตายน้อยกว่า 20%

แต่แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม NaCl 0.3% เมื่อเลี้ยงไปแล้ว 2 สัปดาห์พบว่าสายพันธุ์หลักมีการตายน้อยกว่า 50% ในขณะที่สายพันธุ์ทนเค็มแสดงอาการตอบสนองต่อ NaCl เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

3. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัสดุทดลองทั้งในส่วนของดีเอ็นเอจากแคลลัสและดีเอ็นเอจากต้นกล้ามาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260, 280 และ 320 nm. เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพความบริสุทธิ์และปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสมีความบริสุทธิ์และปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้สูงกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นกล้าข้าว โดยเปรียบเทียบจากอัตราส่วนของ OD_{260}:OD_{280} และหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสูตร (ODXdilution)/20 มีหน่วยเป็น μg./μl.(หรือ ODXdilutionX50 มีหน่วยเป็น μg./ml.)ซึ่งให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสและต้นกล้าที่ความยาวคลื่น 260, 280 และ 320 nm. อัตราส่วนระหว่าง OD_{260}:OD_{280} และปริมาณดีเอ็นเอที่คำนวนได้ของแคลลัสและต้นกล้า

ตัวอย่างที่	แคลลัส					ต้นกล้า				
	OD 260 nm.	OD 280 nm	OD 320 nm.	OD 260:280	ปริมาณDNA μg./μl.	OD 260 nm.	OD 280 nm.	OD 320 nm.	OD 260:280	ปริมาณDNA μg./μl.
1	0.121	0.098	0.007	1.235	2.420	0.014	0.010	0.005	1.400	0.280
2	0.032	0.022	0.009	1.455	0.640	0.011	0.008	0.004	1.375	0.220
3	0.064	0.039	0.014	1.641	1.280	0.008	0.006	0.004	1.333	0.160
4	0.111	0.101	0.049	1.099	2.220	0.003	0.003	0.003	1.000	0.060
5	0.165	0.099	0.027	1.667	3.300	0.009	0.007	0.004	1.286	0.180
6	0.530	0.275	0.034	1.927	10.600	0.005	0.005	0.003	1.000	0.100
7	0.744	0.404	0.051	1.842	14.880	0.024	0.020	0.011	1.200	0.480
8	0.040	0.028	0.011	1.429	0.800	0.003	0.003	0.004	1.000	0.060
9	0.605	0.349	0.009	1.734	12.100	0.017	0.012	0.007	1.417	0.340
10	0.023	0.017	0.100	1.353	0.460	0.006	0.005	0.004	1.200	0.120
11	0.031	0.016	0.001	1.938	0.620	0.015	0.011	0.008	1.364	0.300
12	0.012	0.006	0.002	2.000	0.240	0.009	0.007	0.005	1.286	0.180
13	0.146	0.086	0.013	1.698	2.920	0.009	0.007	0.006	1.286	0.180
14	0.136	0.080	0.013	1.700	2.720	0.007	0.006	0.004	1.167	0.140
15	0.172	0.089	0.004	1.933	3.440	0.005	0.005	0.004	1.000	0.100
$\overline{X}$	0.195 $\pm$0.233	0.114 $\pm$0.126	0.023 $\pm$0.027	1.643 $\pm$0.275	3.909 $\pm$4.658	0.010 $\pm$0.006	0.008 $\pm$0.004	0.005 $\pm$0.002	1.221 $\pm$0.156	0.193 $\pm$0.115

4. การทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอแม่แบบโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัสดุทดลองทั้งในส่วนของดีเอ็นเอจากแคลลัสและดีเอ็นเอจากต้นกล้าข้าว มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย primer UBC457 พบว่า เมื่อใช้ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่เท่ากันสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งจากดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากแคลลัสและได้จากต้นกล้า รูปแบบของโปรไฟล์ดีเอ็นเอที่พบเมื่อเพิ่มปริมาณโดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากแคลลัสให้ความเข้มของแถบดีเอ็นเอและรูปแบบที่เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ดีกว่า

5. การคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับความสามารถในการทนเค็ม

เมื่อทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย UBC primer กับเทคนิค DAF พบว่า primer UBC228 UBC456 UBC457 และ UBC459 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็นดังภาพที่ 1-4 และให้ผลวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอดังตารางที่ 6-7

ตารางที่ 6 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึม โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย UBC primer ด้วยเทคนิค DAF ในแคลลัสของข้าว กข23 สายพันธุ์หลักและสายพันธุ์ทนเค็มทั้ง 2 สายพันธุ์

ไพรเมอร์	จำนวน fragment ทั้งหมด (a)	สายพันธุ์ แคลลัส	จำนวน polymorphic (b)	%polymorphic (b/a x 100)
UBC 228	44	กข23 สายพันธุ์หลัก	41	93
		กข23TC7	40	91
		กข23TC28	39	89
UBC 456	22	กข23 สายพันธุ์หลัก	21	95
		กข23TC7	21	95
		กข23TC28	18	82
UBC 457	25	กข23 สายพันธุ์หลัก	22	88
		กข23TC7	24	96
		กข23TC28	17	68
UBC 59	41	กข23 สายพันธุ์หลัก	38	93
		กข23TC7	26	63
		กข23TC28	24	59

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึม โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย UBC primer ด้วยเทคนิค DAF ในต้นกล้าข้าว กข23 สายพันธุ์หลักและสายพันธุ์ทนเค็มทั้ง 2 สายพันธุ์

ไพรเมอร์	จำนวน fragment ทั้งหมด (a)	สายพันธุ์ ต้นกล้า	จำนวน polymorphic (b)	%polymorphic (b/a x 100)
UBC 228	48	กข23 สายพันธุ์หลัก	43	90
		กข23TC7	46	91
		กข23TC28	43	90
UBC 456	57	กข23 สายพันธุ์หลัก	56	98
		กข23TC7	40	70
		กข23TC28	56	98
UBC 457	67	กข23 สายพันธุ์หลัก	52	78
		กข23TC7	59	88
		กข23TC28	56	84
UBC 459	65	กข23 สายพันธุ์หลัก	60	92
		กข23TC7	56	86
		กข23TC28	58	89

ตารางที่ 6 และ 7 พบว่าการวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากแคลลัสให้ผลดีกว่าการใช้ดีเอ็นเอจากต้นกล้า และผลการทดลองมีความสม่ำเสมอจากการทำซ้ำได้ เมื่อใช้ UBC เป็นไพรเมอร์พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอจากต้นกล้าจะมีจำนวนที่มากและมีปัญหาไม่สามารถทำซ้ำได้ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึมและลักษณะของแถบดีเอ็นเอในเบื้องต้นที่แทรกลักษณะสอดคล้องกับความสามารถในการทนเค็มในแต่ละสายพันธ์ พบว่าไพรเมอร์ UBC457 อาจสามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในข้าวทนเค็มในการตรวจสอบสายพันธ์กข23TC7 และกข23TC28 ได้

6. การสร้างข้าวพันธุ์ลูกผสมเพื่อศึกษาและวิเคราะห์การกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในรุ่นลูก

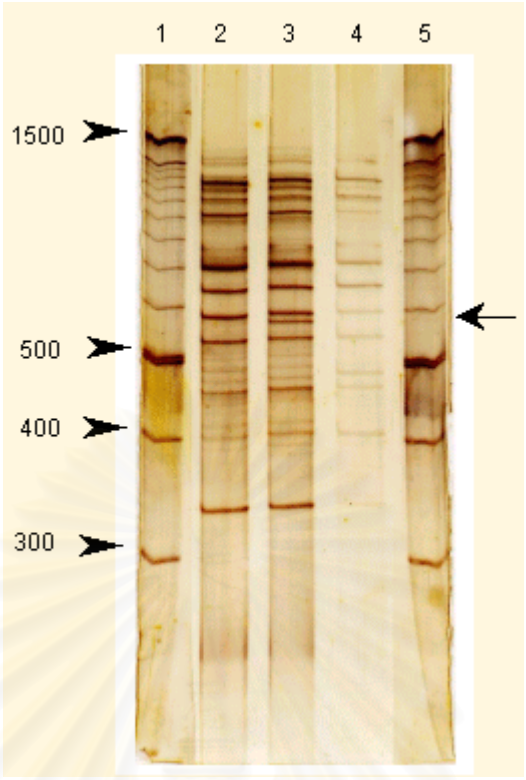
โดยทำการผสมพันธุ์ข้าวสลับพ่อแม่ ทำให้ได้ลูกผสมทั้งหมด 4 cross โดยได้เมล็ดลูกผสมในแต่ละ cross เฉลี่ยประมาณ 40-60 เมล็ด

จากการทดลองการสร้างข้าวพันธุ์ลูกผสมเพื่อศึกษาการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในรุ่นลูกซึ่งพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพโดยเฉพาะเชื้อราสูง ทำให้ไม่สามารถเตรียมวัสดุทดลองในรูปของแคลลัสได้ ซึ่งทำให้ต้องเปลี่ยนวัสดุทดลองมาเป็นการใช้ต้นกล้าแทน

เมื่อนำ DNA ที่สกัดจากต้นกล้าข้าวมาทำการวิเคราะห์เพื่อหาเครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็ม ซึ่งใช้ไพรเมอร์ UBC ที่คัดเลือกได้ในแคลลัสและใช้เทคนิค DAF ในการวิเคราะห์ทั้งในสายพันธุ์พ่อแม่และในสายพันธุ์ลูกผสมพบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีจำนวนมาก ซึ่งทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการจดบันทึกแถบดีเอ็นเอ และปัญหาหลักของการทำการทดลองนี้คือการไม่เกิดซ้ำของแถบดีเอ็นเอซึ่งการแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงอยู่ที่การคัดเลือกหาไพรเมอร์ตัวใหม่ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นกล้าข้าวสามารถทำซ้ำได้และสิ่งที่สำคัญคือสามารถให้เครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มได้

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับความสามารถในข้าวโดยใช้ไพรเมอร์ CU1 , CU2 , CU3 และ CU4 ในต้นกล้าข้าว พบว่าไพรเมอร์ CU1 และ CU2 สามารถให้แถบดีเอ็นเอซึ่งสามารถให้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มได้ดังภาพที่ 5-8 และเมื่อทำการตรวจสอบกลับไปยังลูกผสม ผลการทำ PCR ในรุ่นลูกผสมที่ได้ดังภาพที่ 9-16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

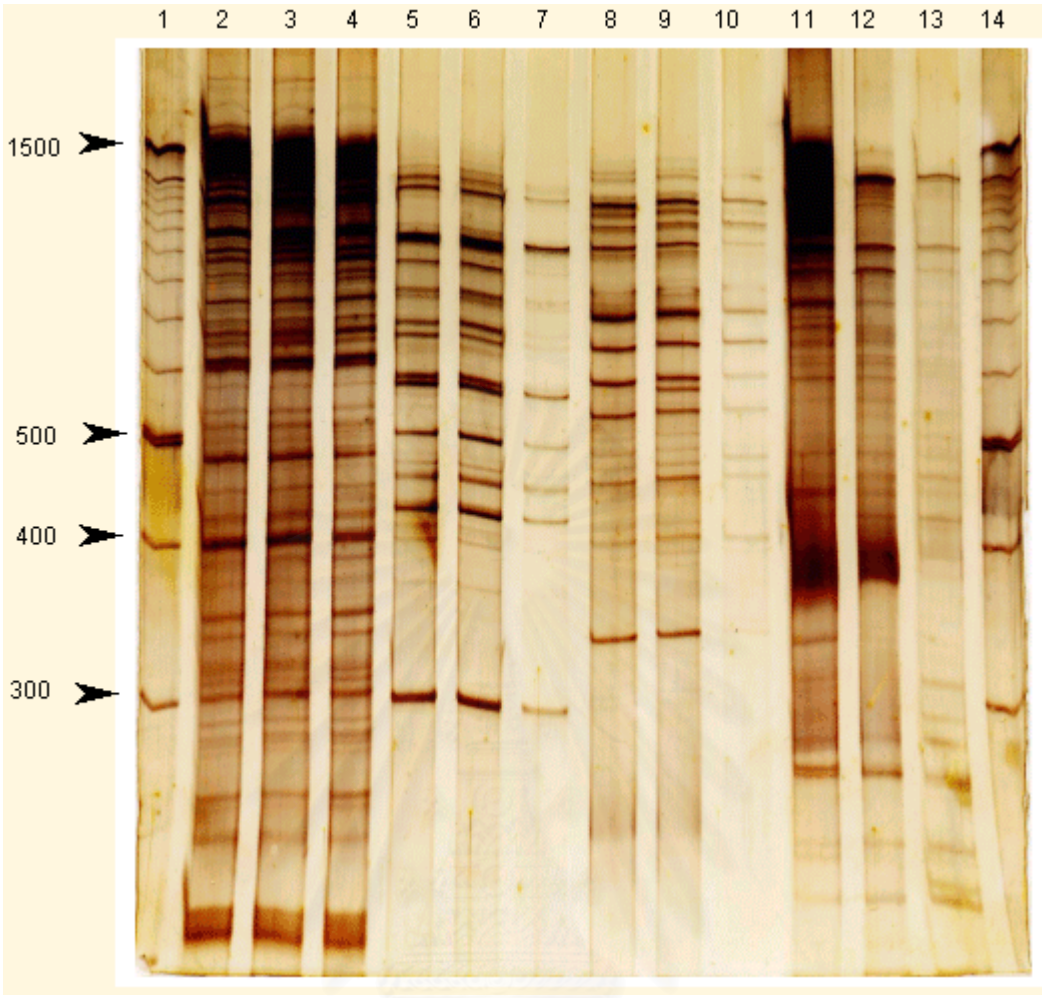


ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์UBC457 โดยเทคนิค DAF ใน 8% polyacrylamide gel ที่ย้อมด้วยเงิน

lane1 และ lane 5 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

lane2-5 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์UBC457 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสของข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข23TC7 และ กข23TC28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ UBC228 UBC456 UBC457 และ UBC459 โดยเทคนิค DAF ใน 8%polyacrylamide gel ที่ย้อมด้วยเงิน

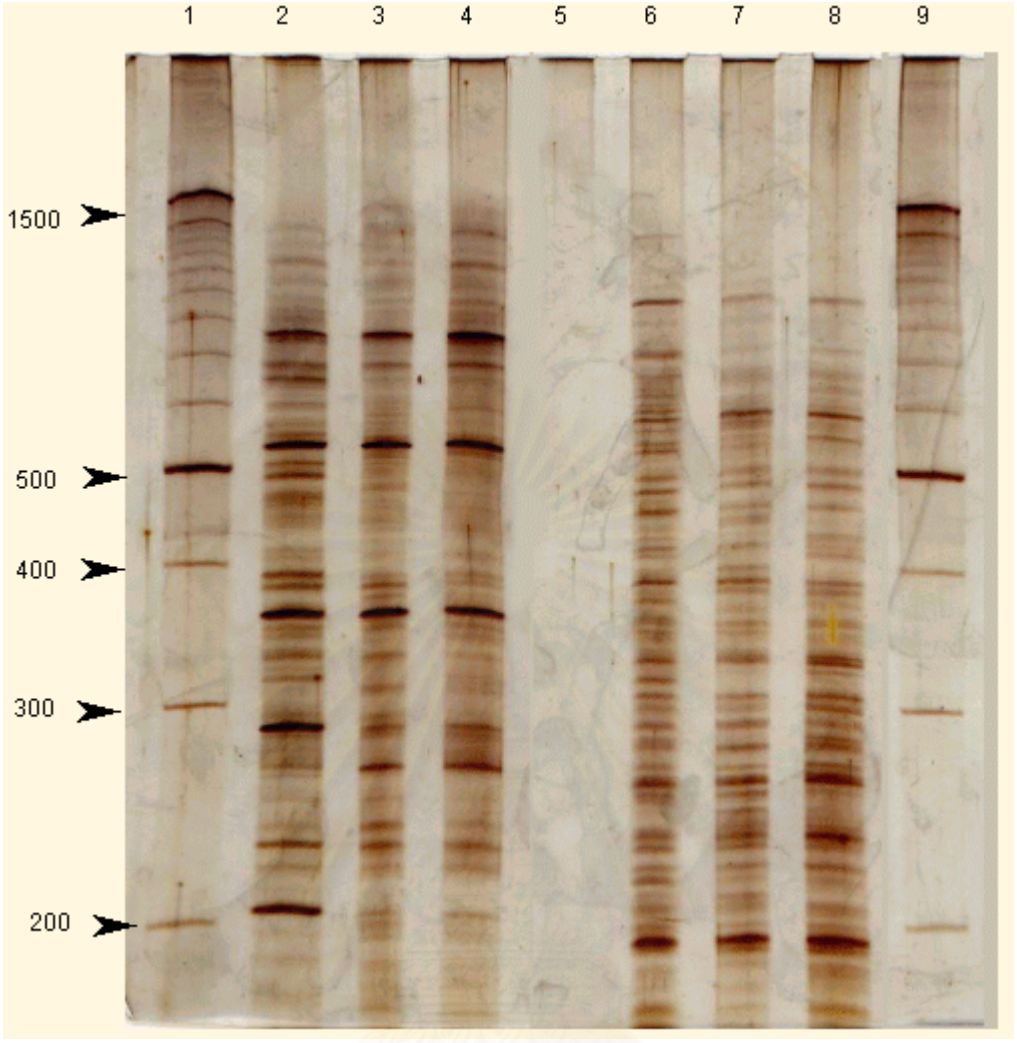
lane1 และ lane 14 แสดงแถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

lane2-4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC228 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ

lane5-7 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC456 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ

lane8-10 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC457 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ

lane11-13 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC459 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ

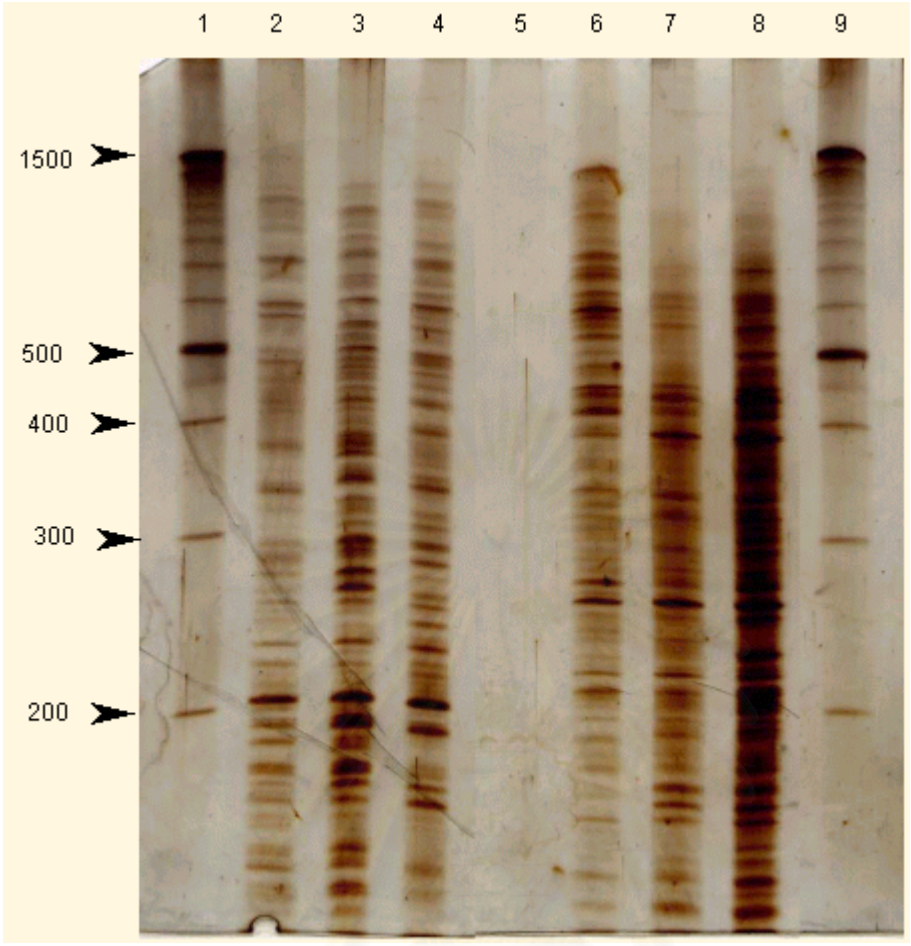


ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ UBC228 และ UBC459 โดยเทคนิค DAF ใน 8%polyacrylamide gel ที่ย้อมด้วยเงิน

lane1 และ lane 9 แสดงแถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

lane2-4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC228 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นกล้าข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ

lane6-8 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC459 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นกล้าข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ



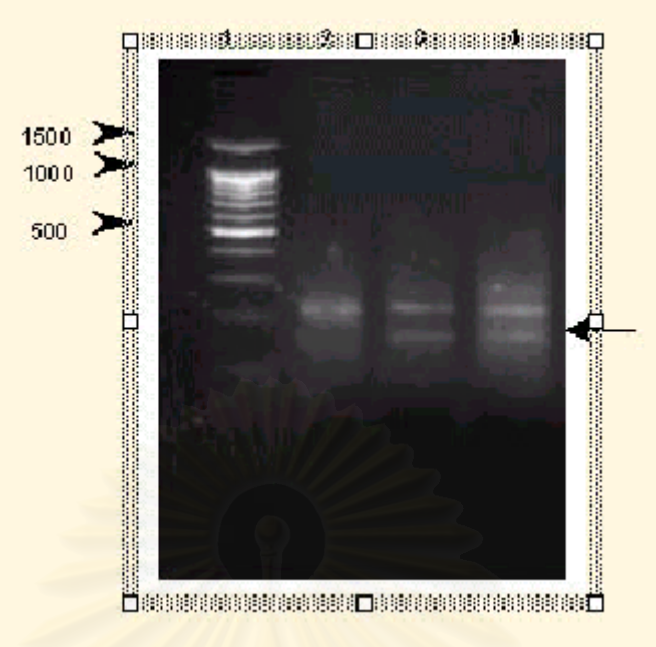
ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ UBC457 และ UBC456 โดยเทคนิค DAF ใน 8%polyacrylamide gel ที่ย้อมด้วยเงิน

lane1 และ lane 9 แสดงแถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

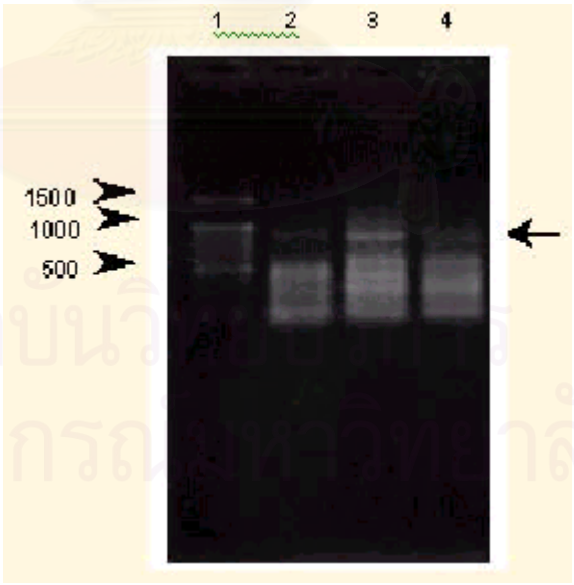
lane2-4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC457 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นกล้าข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ

lane6-8 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC456 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นกล้าข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ

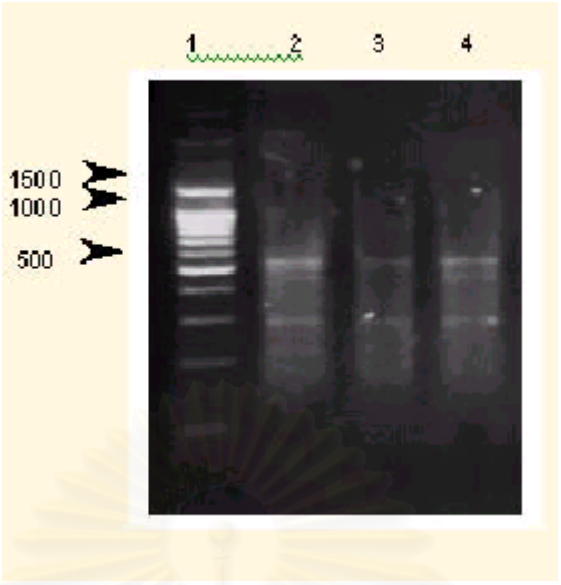
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



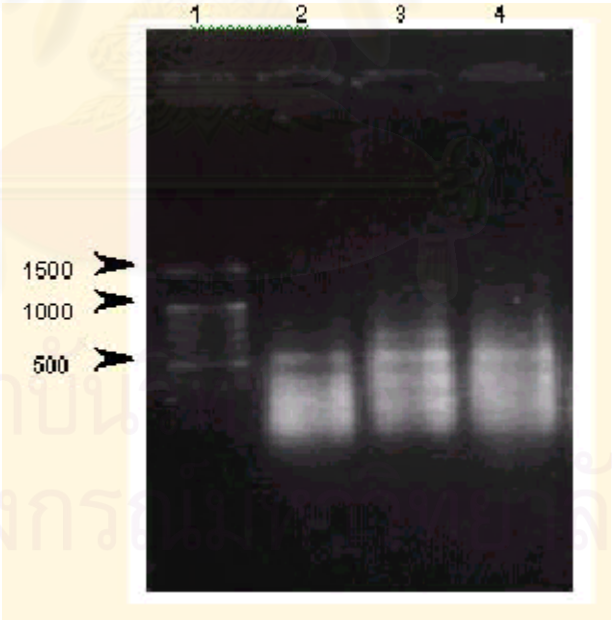
ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ CU1 โดยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel
lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker
lane2-4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ CU1 กับข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข 23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ



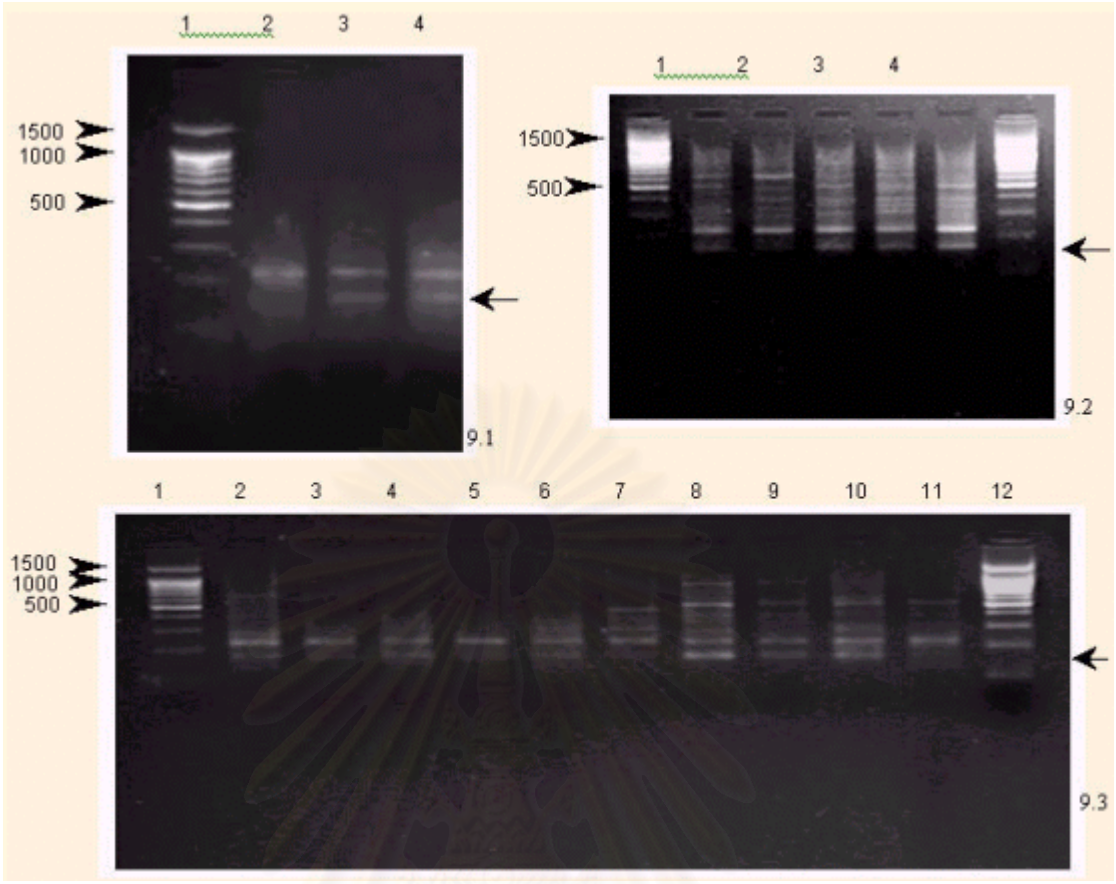
ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ CU2 โดยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel
lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker
lane2-4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ CU2 กับข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข 23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ



ภาพที่ 7 แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ CU3 โดยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel
lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker
lane2-4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ CU3 กับข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข 23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ



ภาพที่ 8 แถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ CU4 โดยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel
lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker
lane2-4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ CU4 กับข้าว กข23สายพันธุ์หลัก, กข 23TC7 และ กข23TC28 ตามลำดับ



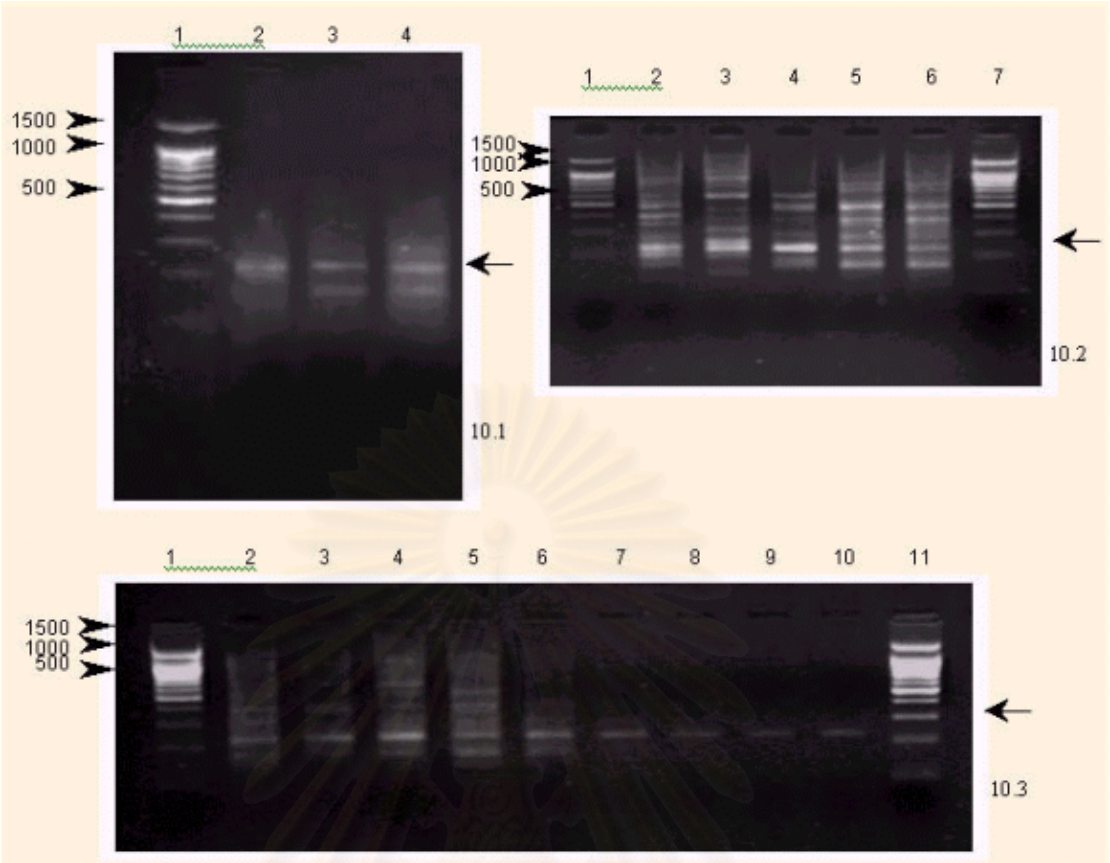
ภาพที่ 9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU1

9.1 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อ-แม่ ซึ่งได้แก่ กข23สายพันธุ์หลัก lane2, กข23TC7 lane3 และ กข23TC28 lane4 เรียงตามลำดับlane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

9.2 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง กข23สายพันธุ์หลัก x กข23TC7 ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับตั้งแต่ lane2-6 lane1 และ lane7 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

9.3 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง กข23TC7 x กข23สายพันธุ์หลัก ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับตั้งแต่ lane2-11

lane1 และ lane12 แสดงแถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

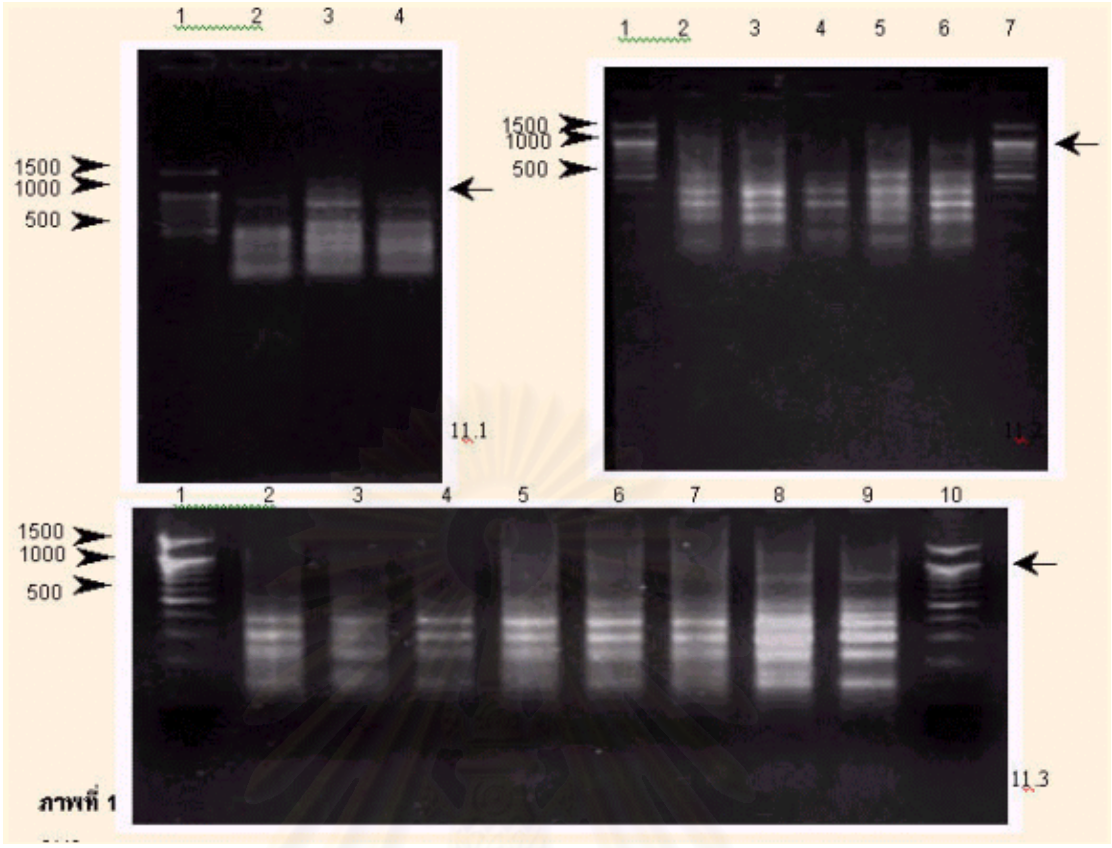


ภาพที่ 10 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU1

10.1 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อ-แม่ ซึ่งได้แก่ กข23สายพันธุ์หลัก lane2, กข23TC7 lane3 และ กข23TC28 lane4 เรียงตามลำดับ lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

10.2 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23สายพันธุ์หลัก x กข23TC28 ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่างเรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-6 lane1 และ lane7 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

10.3 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23TC28 x กข23สายพันธุ์หลัก ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-10 lane1 และ lane11 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker



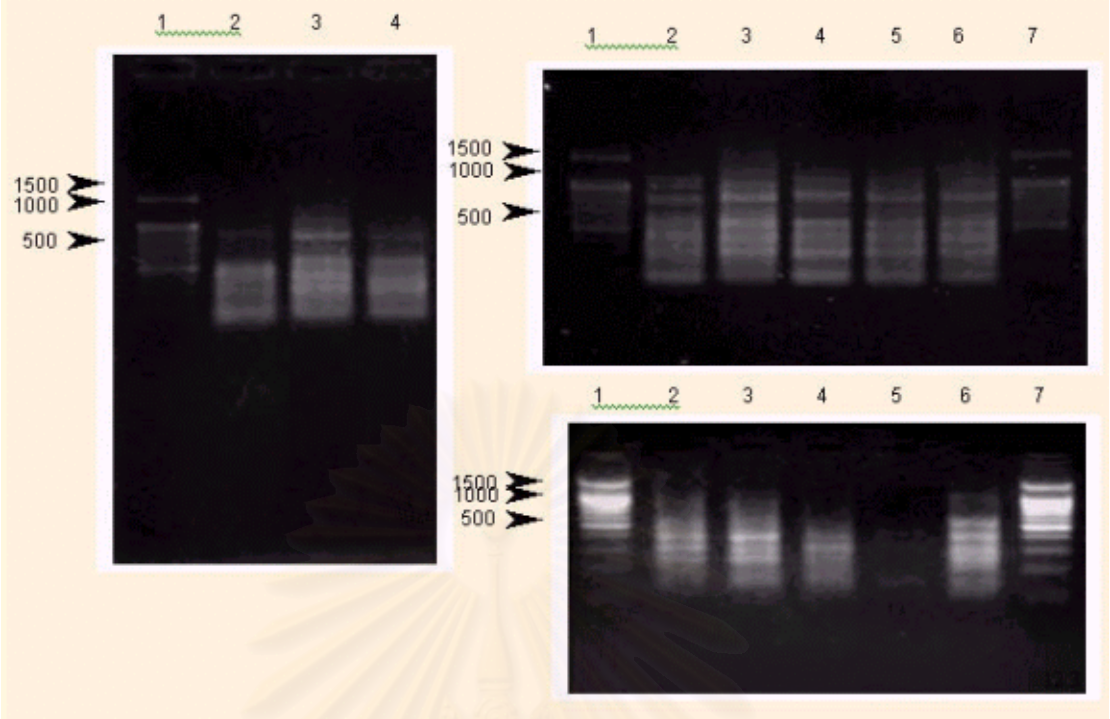
ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU2

11.1 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อ-แม่ ซึ่งได้แก่ กข23สายพันธุ์หลัก lane2, กข23TC7 lane3 และ กข23TC28 lane4 เรียงตามลำดับ lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

11.2 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23สายพันธุ์หลัก x กข23TC7 ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่างเรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-6 lane1 และ lane7 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

11.3 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23TC7 x กข23สายพันธุ์หลัก ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-9

lane1 และ lane10 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker



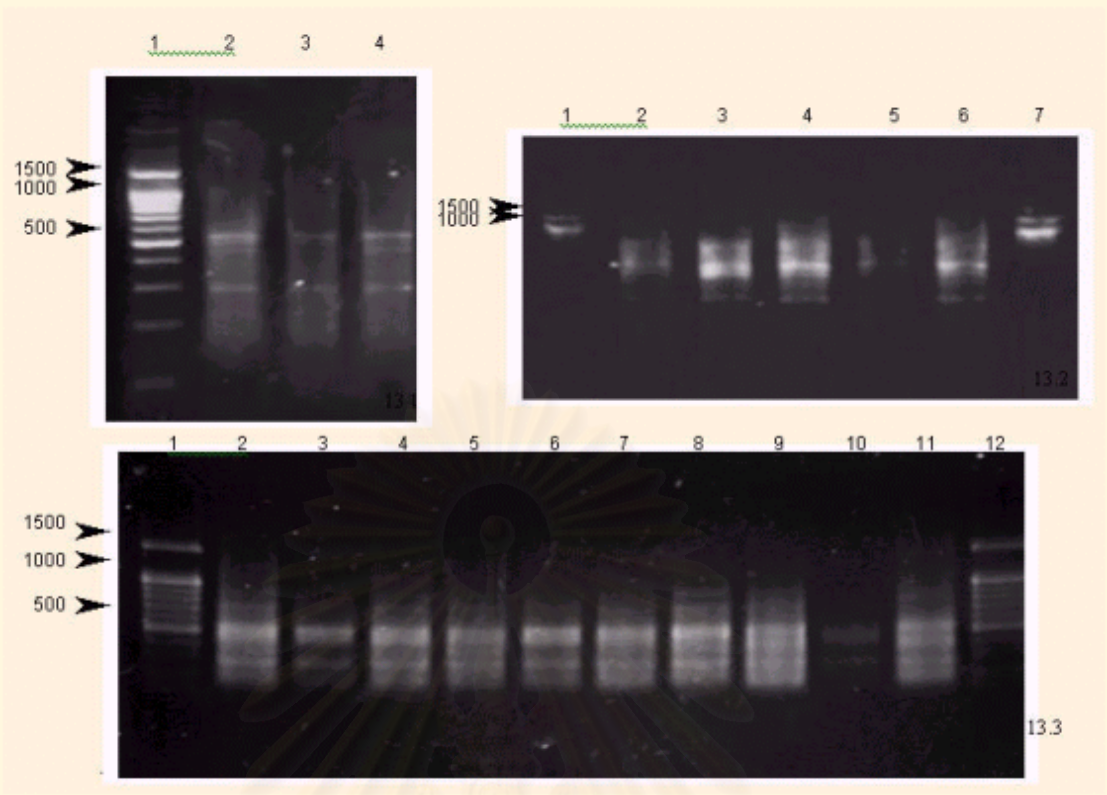
ภาพที่ 12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel โดยใช้ไมอร์ CU2

12.1 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อ-แม่ ซึ่งได้แก่ กข23สายพันธุ์หลัก lane2, กข23TC7 lane3 และ กข23TC28 lane4 เรียงตามลำดับ lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

12.2 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23สายพันธุ์หลัก x กข23TC28 ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่างเรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-6 lane1 และ lane7 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

12.3 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23TC28 x กข23สายพันธุ์หลัก ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-6lane1 และ lane7 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



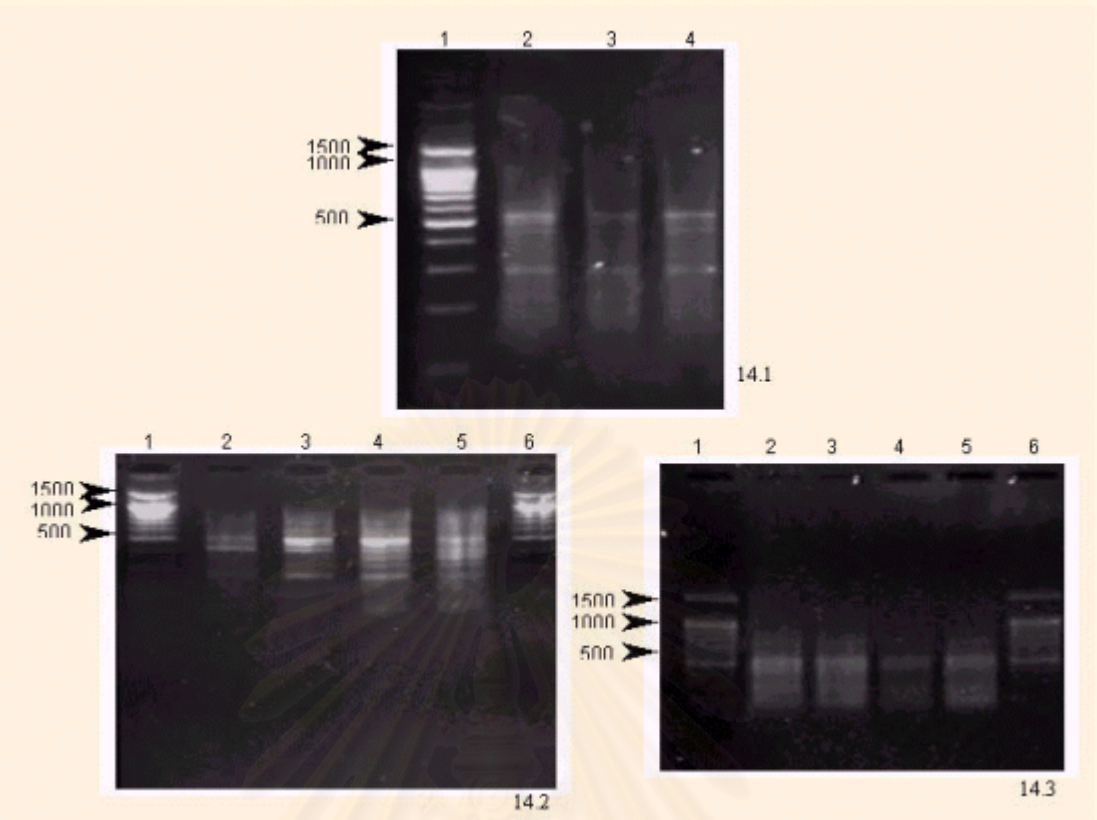
ภาพที่13 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU3

13.1 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อ-แม่ ๆซึ่งได้แก่ กข23สายพันธุ์หลัก lane2, กข23TC7 lane3 และ กข23TC28 lane4 เรียงตามลำดับlane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

13.2 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง กข23สายพันธุ์หลัก x กข23TC7 ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่างเรียงตามลำดับตั้งแต่ lane2-6 lane1 และ lane7 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

13.3 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง กข23TC7 x กข23สายพันธุ์หลัก ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับตั้งแต่ lane2-11

lane1 และ lane12 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

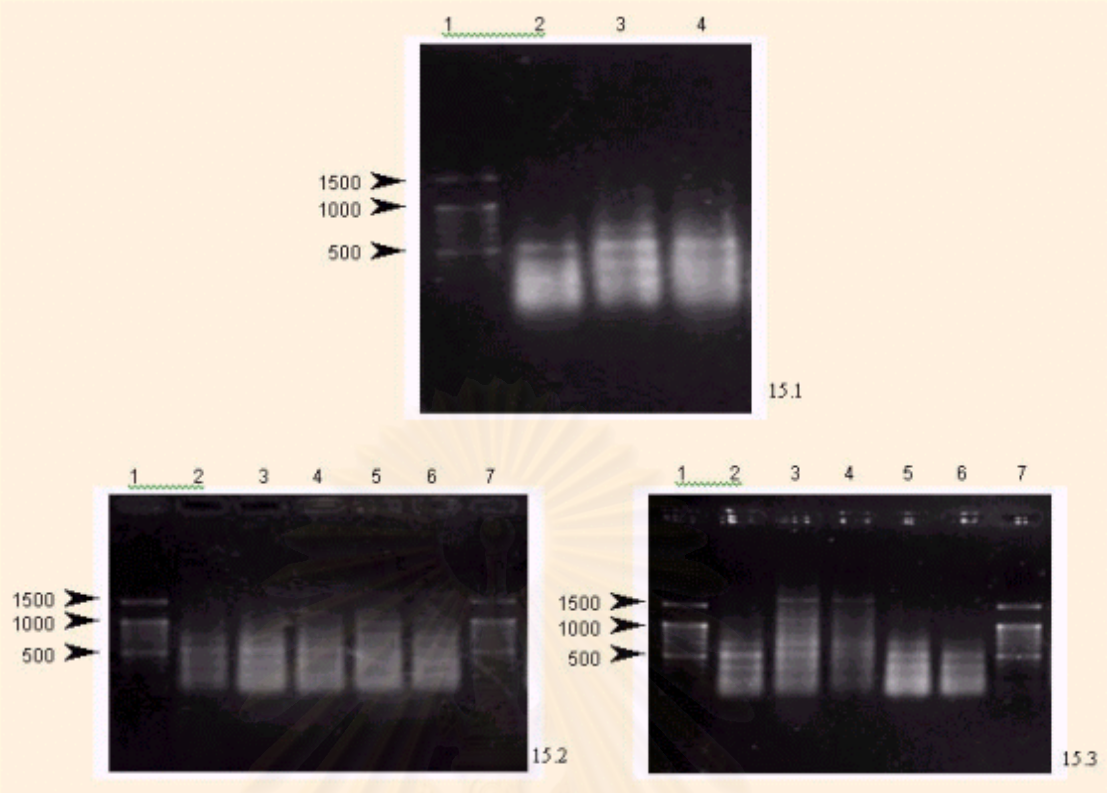


ภาพที่ 14 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU3

14.1 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อ-แม่ ซึ่งได้แก่ กข23สายพันธุ์หลัก lane2, กข23TC7 lane3 และ กข23TC28 lane4 เรียงตามลำดับ lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

14.2 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง กข23สายพันธุ์หลัก x กข23TC28 ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่างเรียงตามลำดับตั้งแต่ lane2-5 lane1 และ lane6 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

14.3 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง กข23TC28 x กข23สายพันธุ์หลัก ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับตั้งแต่ lane2-5lane1 และ lane6 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker



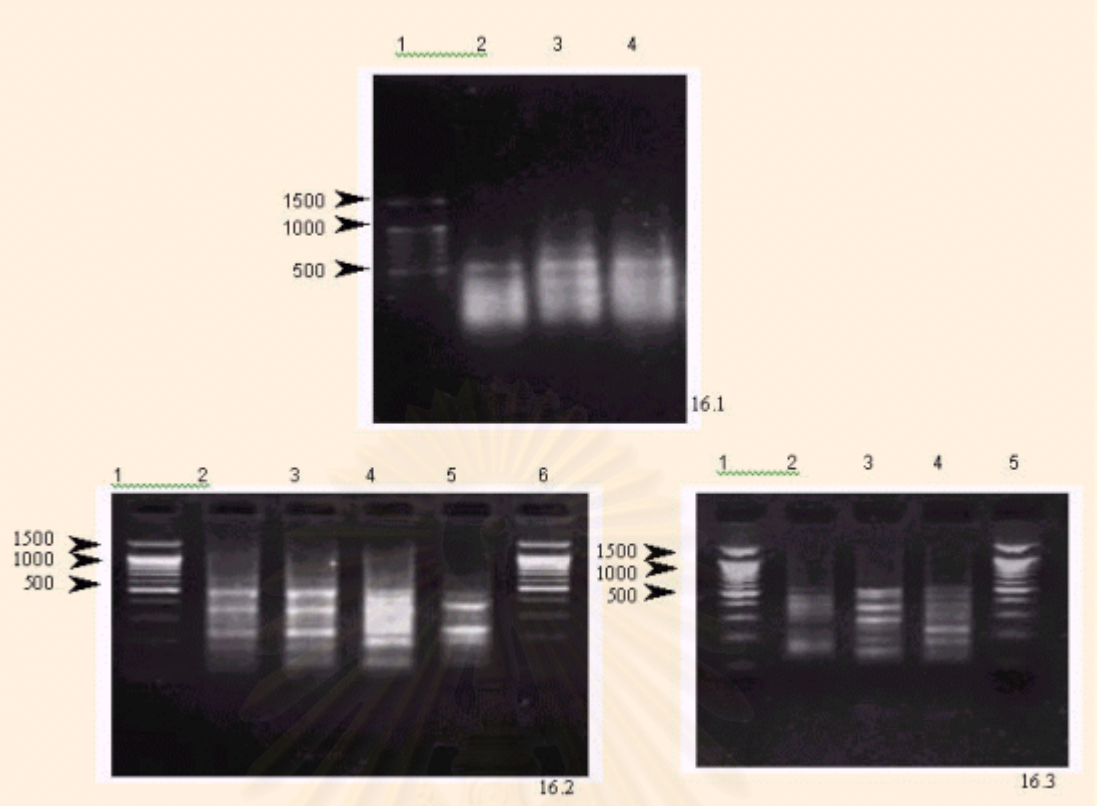
ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU4

15.1 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อ-แม่ ซึ่งได้แก่ กข23สายพันธุ์หลัก lane2, กข23TC7 lane3 และ กข23TC28 lane4 เรียงตามลำดับ lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

15.2 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23สายพันธุ์หลัก x กข23TC7 ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-6 lane1 และ lane7 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

15.3 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23TC7 x กข23สายพันธุ์หลัก ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-6

lane1 และ lane7 แสดงแถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker



าพที่ 16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใน 1.5%agarose gel โดยใช้ไพรเมอร์ CU4

16.1 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อ-แม่ ซึ่งได้แก่ กข23สายพันธุ์หลัก lane2, กข23TC7 lane3 และ กข23TC28 lane4 เรียงตามลำดับ lane1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

16.2 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23สายพันธุ์หลัก x กข23TC28 ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่างเรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-5 lane1 และ lane6 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

16.3 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ลูกผสม ระหว่าง กข23TC28 x กข23สายพันธุ์หลัก ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง เรียงตามลำดับ ตั้งแต่ lane2-4 lane1 และ lane5 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp DNA ladder marker

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นงานต่อเนื่องจากโครงการ New Varieties of Rice for Saline and Acid Soil through Tissue Culture ที่ประสบความสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวทนเค็มจาก somaclone Vajrabhaya and Vajrabhaya(1991) และวันชัย สังฆ์สุข (2542) ศึกษาการสะสมโพรลีนและน้ำตาลของข้าวทนเค็มสายพันธุ์ กข23TC7 และกข23TC28 พบว่าเมื่อต้นข้าวอยู่ในภาวะเค็มและแล้ง สายพันธุ์ทนเค็มมีการสะสมโพรลีนและน้ำตาลมากกว่าข้าวสายพันธุ์ปกติ (สายพันธุ์หลัก) โดยได้ผลตรงกับ วรัญญา คำปัน (2542) ซึ่งศึกษาในข้าวสายพันธุ์ทนแล้งที่คัดเลือกจากsomacloneเช่นกัน งานวิจัยนี้ต้องการทราบว่าจะสามารถใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในระดับ ดีเอ็นเอบ่งบอกความสามารถในการทนเค็มของข้าวได้หรือไม่ จึงเลือกใช้ข้าวกข23TC7 และกข23 TC28 เป็นตัวอย่างศึกษา

เพื่อเป็นการยืนยันว่า กข23TC7 และ กข23TC28 ซึ่งได้มาจากโครงการดังกล่าวโดยอยู่ในรุ่นที่ 9 แล้วนั้น ยังคงมีลักษณะการทนเค็มอยู่จริง จึงได้ทำการทดสอบโดยปลูกข้าวระยะ 5 ใบ ในสารละลายปุ๋ยสูตร WP No.2 ที่เติม Nacl 0.3% ค่าการนำกระแสไฟฟ้า 6-7 mmho/cm เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดตายของสายพันธุ์ทนเค็มสูงกว่าของสายพันธุ์หลัก โดย กข23TC7 รอดตาย 86.3% กข23TC28 รอดตาย 69.5% ในขณะที่สายพันธุ์หลักรอดตาย 57.6% เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการอยู่รอดของสายพันธุ์ทนเค็มของทั้งสองสายพันธุ์นี้ที่คัดเลือกด้วย NaCl 5% ในน้ำปุ๋ย WP ค่าการนำกระแสไฟฟ้า 9-10 mmho/cm 4 สัปดาห์เช่นกัน พบว่าสายพันธุ์หลักมีอัตราการรอดตาย 2-3% ในขณะที่สายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกได้อยู่ในระดับ 23-28% โดยทำการคัดเลือกในรุ่นที่ 3 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1986) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาจาก somaclone นี้ยังคงลักษณะเดิมอยู่

ผลการศึกษาสูตรอาหารเพื่อชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอ

ผลการศึกษาเบื้องต้นถึงคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่สกัดมาจากแคลลัสและต้นกล้า เพื่อนำมาศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมทางชีวโมเลกุล พบว่าแคลลัสให้ดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติที่ดีกว่า จึงจำเป็นต้องศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะต่อการชักนำและเลี้ยงแคลลัสของข้าวกข23 ทั้งนี้เพราะข้าวกข23 เป็นพันธุ์ที่ชักนำเอ็มบริโอได้ยากกว่าข้าวไทยพันธุ์อื่น ๆ เช่น ขาวดอกมะลิ 105 เหลืองประทิว 123 หรือนางมลเอสเป็นต้น (มนทกานติ วัชราภัย, ติดต่อเป็นการส่วนตัว) ได้ทดลองเลี้ยงแคลลัสโดยชักนำจากเอ็มบริโอที่เจริญเต็มที่ เปรียบเทียบในอาหารต่าง ๆ 5 สูตร สรุปได้ว่าการ

เลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวกข23 นั้น สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดโดยได้ปริมาณแคลลัสมากที่สุดและเป็น E-callus ทั้งหมด คือ สูตรที่ดีที่สุดของ สุดารัตน์ นิติวัฒนะ (2538) ซึ่งในการทดลองนี้เรียกว่าสูตร A โดยได้แคลลัส 0.2355 กรัมต่อเอ็มบริโอ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ส่วนสูตรที่ให้ผลรองลงมาคือสูตร M-019 ซึ่งเป็นสูตรอาหารสำหรับชักนำแคลลัสจากอับเรณูของ Raina (1993) โดยได้ E-callus เช่นกัน แต่ได้น้ำหนักแคลลัสน้อยกว่าคือ 0.1215 กรัมต่อเอ็มบริโอ ส่วนสูตรอื่น ๆ อีก 3 สูตรได้ผลน้อยกว่านี้มาก และบางสูตรยังเป็น NE-callus(แคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้) อีกด้วย ซึ่ง E-callus เป็น แคลลัสที่มีศักยภาพสูงในการเกิด plant regeneration

เมื่อศึกษาถึงองค์ประกอบของอาหารทั้ง 5 สูตรเปรียบเทียบกัน พบว่าในกลุ่มของธาตุอาหารหลัก สูตรA และ M-019 เท่านั้นที่มีเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ในขณะที่อีก 3 สูตรไม่มี ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเกลือแอมโมเนียมมีผลช่วยให้ pH ของอาหารไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ยิ่งกว่านั้นอัตราส่วนของ N ในรูปของ NH_4^+ ที่สมดุลย์กับ N ในรูปอื่นน่าจะช่วยกระตุ้นให้การชักนำแคลลัสดีขึ้นส่วนองค์ประกอบของธาตุอาหารทั้ง 5 สูตรไม่แตกต่างกันมากนัก ในด้านความแตกต่างของสารอินทรีย์เสริมในสูตรต่าง ๆ พบว่าสูตร A มีสารอินทรีย์เสริมมากที่สุด (ตารางที่ 8) เช่น มี biotin กรดอะมินโนหลายตัว รวมทั้งมีน้ำสกัดจากมันฝรั่งด้วย จึงทำให้องค์ประกอบของอาหารสมบูรณ์กว่าสูตรอื่น ยิ่งกว่านั้นเกี่ยวกับการใช้มันฝรั่งได้มีงานวิจัยหลายงานที่แสดงให้เห็นถึงข้อดีของการใช้มันฝรั่ง Vajrabhaya, Supaokit และ Vajrabhaya (1994) รายงานว่า การเลี้ยงกล้ากล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) ด้วยอาหารที่ประกอบด้วยมันฝรั่ง KNO_3 และน้ำตาลเท่านั้นสามารถใช้เลี้ยงกล้ากล้วยไม้ได้ดีกว่าสูตรกล้วยไม้ทั่วไปมาก สำหรับสูตร M-019 ซึ่งให้ผลรองลงมาโดยที่แคลลัสที่ชักนำได้เป็น E-callus เช่นกันและปริมาณของแคลลัสที่ได้นั้นน้อยกว่าสูตร A เท่าตัว ซึ่งสูตร M-019 เป็นสูตรที่สามารถชักนำแคลลัสของข้าวโดยการเลี้ยงอับเรณูของลูกผสม กข21 กับสุพรรณบุรี90 ได้ผลดีมาแล้ว (สุภาพร จันทร์บัวทอง, 2541) ซึ่งการเลี้ยงอับเรณูเป็นเทคนิคที่ยากกว่าการเลี้ยงเอ็มบริโอ ดังนั้นหากแปลงสูตร M-019 โดยการเติมสารอินทรีย์เสริมลงไปเช่นเดียวกับสูตร A อาจสามารถชักนำแคลลัสของ กข23 จากเอ็มบริโอได้ดีกว่าสูตร A ก็ได้

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆที่ใช้ชักนำแคลลัส

องค์ประกอบ	สูตรอาหารเลี้ยงแคลลัส				
	A	CU	M-019	SK-1	Y
ธาตุอาหารหลัก					
KNO_3	+	+	+	+	+
$CaCl_2\ 2H_2O$	+	+	+	+	+
$MgSO_4\ 7H_2O$	+	+	+	+	+
KH_2PO_4	+	+	+	+	+
$(NH_4)_2SO_4$	+	−	+	−	−
ธาตุอาหารรอง					
$MnSO_4\ 4H_2O$	+	+	+	+	+
$ZnSO_4\ 7H_2O$	+	+	+	+	+
KI	+	+	+	+	+
H_3BO_3	+	+	+	+	+
$Na_2MoO_4\ 2H_2O$	+	+	+	+	+
$CuSO_4\ 5H_2O$	+	+	+	+	+
$CoCl_2\ 6H_2O$	+	+	+	−	+
$FeSO_4\ 7H_2O$	+	+	+	+	+
$Na_2EDTA\ 2H_2O$	+	+	+	+	+
สารอินทรีย์อื่น ๆ					
วิตามิน					
Myo-inositol	+	−	+	+	−
Nicotinic acid	+	+	−	+	+
Pyridoxine HCl	+	+	+	+	+
Thiamine HCl	+	+	+	+	+
Biotin	+	−	−	−	−
Inositol	−	−	−	−	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8(ต่อ) เปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆที่ใช้ชักนำแคลลัส

องค์ประกอบ	สูตรอาหารเลี้ยงแคลลัส				
	A	CU	M-019	SK-1	Y
กรดอะมิโน					
Glycine	+	−	+	+	−
Proline	+	−	−	−	−
Arginine	+	−	−	−	−
Asparagine	+	−	−	−	−
Alanine	+	−	−	−	−
Glutamine	+	−	−	−	−
สารควบคุมการเจริญ					
2,4-D	+	+	+	+	+
NAA	−	−	−	+	−
BAP	+	−	−	−	−
Kinetin	−	+	+	+	−
สารอินทรีย์เสริม					
Yeast Extract	−	−	−	−	+
น้ำสกัดมันฝรั่ง	+	−	−	−	−
น้ำมะพร้าวอ่อน	+	+	−	−	−
Sucrose	+	+	−	+	+
Maltose	−	−	+	−	−
สารอินทรีย์เสริม					
Casein hydrolysate	−	−	−	+	−

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปรียบเทียบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสและต้นกล้า

ผลการศึกษาคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสเปรียบเทียบกับที่สกัดจากต้นกล้า พบว่าดีเอ็นเอจากแคลลัสมีความบริสุทธิ์กว่าดีเอ็นเอจากต้นกล้า ทั้งยังได้ปริมาณมากกว่าด้วย โดยดูจากค่า OD_{260}:OD_{280} (ตารางที่ 5) ดังนั้น ในการตรวจหาเครื่องหมายพันธุกรรมจึงน่าจะใช้ ดีเอ็นเอจากแคลลัสแต่เนื่องจากเมื่อทำการผสมข้ามสายพันธุ์ของพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์หลัก ลูกผสมที่ได้มีการปนเปื้อนของเชื้อราและได้เมล็ดน้อย จึงมีความจำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอจากต้นกล้าแทน

สำหรับดีเอ็นเอจากแคลลัสของสายพันธุ์ทนเค็ม ได้ทำการคัดเลือกแคลลัสทนเค็มก่อน โดยนำแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสูตร A ที่เติม NaCl เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนแล้วจึงสกัดดีเอ็นเอ ส่วนแคลลัสของสายพันธุ์หลักที่ใช้เปรียบเทียบไม่ต้องผ่านการคัดเลือกด้วย NaCl

สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดมาจากต้นกล้านั้น ใช้ต้นกล้าอายุ 1 สัปดาห์ มีขนาด 3-5 ซ.ม. จากโคนต้นถึงปลายใบ โดยสกัดจากส่วนต้นเท่านั้น (ไม่ใช่ส่วนราก) ดังนั้นแม้จะเป็นต้นกล้าที่มาจากสายพันธุ์ทนเค็ม ต้นกล้าที่ใช้ก็มิได้ผ่านการคัดเลือกมาก่อน ในกรณีนี้ต้นกล้าที่ได้อาจเป็นต้นที่ไม่ทนเค็มก็ได้ (กข23TC7 อัตรารอดตายที่ NaCl 0.3% คือ 86.3% กข23TC28 รอดตาย 69.5% กข23 รอดตาย 57.6%)

การคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะ

ในการหาไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงและสัมพันธ์กับความสามารถในการทนเค็มนั้น ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ได้แก่ UBC228, UBC456, UBC457 และ UBC459 เป็นไพรเมอร์ที่ให้ความเสถียรและเคยใช้ในการจำแนกไม้ดอก (Fritsch และคณะ, 1993) และเห็ดหอม (Phuangphoo,1999) โดยมีพื้นฐานคือสำรวจความเหมาะสมของไพรเมอร์โดยการวิเคราะห์ทั้งหมด 480 ตัว ด้วยวิธี RAPD PCR ส่วนไพรเมอร์ในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ CU1, CU2, CU3 และ CU4 (ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์) เพื่อทดสอบดูความสัมพันธ์ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเหล่านั้น ทั้งในต้นพ่อ แม่ ของสายพันธุ์หลักและสายพันธุ์ทนเค็ม และดูการกระจายตัวในพันธุ์ลูกผสม

ปัจจัยสำคัญอันหนึ่งของปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR คือ ความเฉพาะเจาะจง และความสัมพันธ์กันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ Caetano-Arolles และคณะ (1992) ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ขนาดต่างๆต่อความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบ รูปแบบการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอที่ได้ และอิทธิพลที่มีผลต่อการเข้าจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ

โดยการเพิ่มอุณหภูมิ annealing temperature พบว่าการเปลี่ยนแปลงไปของลำดับเบสที่อยู่ใกล้กับส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของ PCR product ที่ได้เปลี่ยนแปลงไป ส่วนอุณหภูมิ annealing temperature ที่เปลี่ยนแปลงไปจะลดความสามารถของการเพิ่มปริมาณของไพรเมอร์สายสั้นๆ ลง

เทคนิค DAF ในงานวิจัยนี้ มีความแตกต่างจากของเดิม คือ จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็น 10 เบส ซึ่งในเทคนิค DAF จะใช้เพียง 8 เบสเท่านั้น (Trigiano และ Caetono-Anolles, 1998) การเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์เป็นการเพิ่มความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบให้มากยิ่งขึ้นโดยอาศัยการวิเคราะห์ที่แม่นยำ โดยเฉพาะในเรื่อง resolution จาก gel polyacrylamide และการย้อมด้วยโลหะเงินมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ นอกจากนี้สามารถเก็บผลการศึกษาในรูปแผ่นเจลไว้ใช้ถาวร ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมา Phuangphoo(1999) ใช้เทคนิคดังกล่าวในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมซึ่งให้ผลดี ส่วนในงานวิจัยนี้พบว่าเทคนิค DAF สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มโดยใช้ ดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสได้ดีแต่เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นกล้าข้าวลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ UBC และคัดเลือกได้ด้วยเทคนิค DAF พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีจำนวนมาก (non-specific band) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความไม่เฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ และไม่สามารถทำซ้ำได้แม้จะทำการทดลองในลักษณะเดียวกันหลายครั้ง ซึ่งการแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงอยู่ที่การคัดเลือกหาไพรเมอร์ตัวใหม่ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นกล้าข้าว สามารถทำซ้ำได้ และสิ่งที่สำคัญคือ สามารถวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มได้

การวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มและดูการกระจายตัวในลูกผสม

ผลการวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็มโดยใช้เทคนิค RAPD กับไพรเมอร์ CU1, CU2, CU3 และ CU4 พบว่าไพรเมอร์ CU1 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในข้าวสายพันธุ์ทนเค็มทั้งสองสายพันธุ์อย่างชัดเจน ส่วนไพรเมอร์ CU2 พบว่าแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมของข้าวทนเค็ม กข23TC7 เป็นแถบที่เข้มกว่าปกติ และเมื่อตรวจดูการกระจายตัวในรุ่นลูกผสมจะพบว่าในลูกผสมบางส่วนพบแถบดีเอ็นเอแถบเดียวกันนี้ เมื่อดูการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทดสอบโดยใช้ค่า ไค-สแควร์ มาช่วยในการทดสอบพบว่าลูกผสมที่ได้มีการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นแบบ 1:1 ขณะที่เมื่อทำการตรวจสอบกลับไปดูอัตราการรอดตายของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าในกลุ่ม

ประชากรเดียวกันยังมีต้นข้าวบางส่วนในสายพันธุ์ทนเค็มที่ตายจากการทดสอบในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ในสัดส่วนที่สอดคล้องกับการกระจายตัวของยีนดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่ความสามารถในการทนเค็มในข้าวทั้งสองถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่า 1 ชนิด นอกจากนี้เมื่อศึกษาในลูกผสม reciprocal cross ทั้ง 2 cross ซึ่งพบว่าผลการทดลองให้ผลการกระจายตัวเป็นแบบเดียวกันสามารถระบุได้ว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่พบดังกล่าวไม่อยู่บนโครโมโซมเพศ

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ปกติและข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่มาจาก somaclonal variation ดังนั้นพื้นฐานทางพันธุกรรมของข้าวทั้งสองนั้นจึงไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีเพียงบางส่วนของข้าวทนเค็มที่ได้เท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงในการคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้จากโครงการนี้ทำการคัดเลือกโดยให้ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ปกติเพียงแค่เพิ่มความสามารถในการทนเค็มเท่านั้น ส่วนในด้านสัณฐานวิทยาให้คงเหมือนกับสายพันธุ์ปกติ ถ้าพบความแตกต่างเกิดขึ้นในต้นใดจะคัดทิ้งทันที ในด้านสรีรวิทยานั้น วันชัย สังฆ์สุข (2542) พบว่าในข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้จากโครงการมีการสะสมโพรลีนและน้ำตาล (total sugar) เพิ่มมากกว่าสายพันธุ์ปกติเมื่ออยู่ในภาวะเค็มซึ่งได้ผลตรงกับงานของวรัญญา คำปัน (2542) ที่ทำในข้าวทนแล้งพบการสะสมโพรลีนและน้ำตาลมากขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะแล้ง จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาจะพบว่ารายงานที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมความสามารถในการทนเค็มของข้าวและกลไกต่าง ๆ นั้นมีอยู่เป็นจำนวนมากและส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกันและส่งผลกระทบซึ่งกันและกัน เช่น การเพิ่มขึ้นและลดลงของโปรตีนบางชนิด เช่น โพลีเอมีน (polyamines) (Krishnamurthy and Bhagwat, 1989) การปรับตัวโดยการลด water potential ภายในเซลล์ให้ต่ำกว่าภายนอก (Taiz and Zeiger, 1991) รวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ (Umeda *et al.,* 1994) มีผลต่อความสามารถในการทนเค็มได้ทั้งสิ้น จากการวิจัยของ Cales และคณะ (1990) พบว่าเมื่ออยู่ในภาวะเค็มจะทำให้การสะสม mRNA ของยีน *sal*T เพิ่มมากขึ้นและยังพบโปรตีนที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออก 8 ชนิด layer และ Caplan (1998) พบว่าสาร intermediate ที่ได้จากการสังเคราะห์โพรลีน สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *sal*T และ *dhn*4 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมค่าออสโมติกในข้าว Hoshida และคณะ (2000) ศึกษาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพของความสามารถในการทนเค็ม โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน glutamine synthetase (GS2) ซึ่งมีอยู่แล้วในคลอโรพลาสต์ของข้าว และทำการตัดต่อยีนเข้าสู่ข้าว จากผลการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนทนเค็มที่พบและการกระจายตัวที่ไม่ได้สัดส่วนของประชากรเป็น 1:0 ในรุ่นลูกผสมสามารถนำมาใช้สรุปได้ว่ายีนทนเค็มเหล่านั้นไม่ใช่ยีนเดียวที่มีลักษณะควบคุมแบบ dominant หรือ recessive และน่าจะเป็นยีนที่มีหลายยีน (Multiple gene) ซึ่งในการแสดงออกของยีนแต่ละยีนนั้นมีผลต่อปริมาณของความสามารถในการ

ทนเค็มในแต่ละระดับซึ่งจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับจำนวนของยีนที่แสดงออก และเป็นลักษณะการแสดงออกในเชิงปริมาณ (Quantitative Trait Loci; QTL) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yeo (1998) ในการทดลองนี้ได้ทำการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมที่เกิดขึ้นระหว่างข้าวปกติและข้าวทนเค็มโดยนำเทคนิค RAPD มาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการชี้บอกความสามารถในการทนเค็ม ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่ตรวจพบในการวิจัยนี้จึงน่าจะเป็นเพียงส่วนหนึ่งซึ่งมีความเกี่ยวโยงและสัมพันธ์กับความสามารถในการทนเค็มของข้าวได้ ถ้าเป็นจริงตามสมมติฐานนี้จะมีประโยชน์ต่อการตรวจสอบสายพันธุ์ทนเค็มของข้าวกข23และข้าวพันธุ์อื่นๆ โดยทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์และลักษณะการกระจายตัวต่างๆก่อน จึงหวังว่าวิธีที่ใช้นี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงให้ได้ข้าวที่มีความสามารถทนเค็มในลักษณะ Molecular assist breeding ได้ในอนาคต

ในการศึกษาขั้นต่อไป ควรมีการตรวจสอบความสามารถในการทนเค็มของข้าวลูกผสมที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อตรวจสอบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมที่ตรวจพบในลูกผสมมีความเกี่ยวข้องกับการทนเค็มทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณมากน้อยเพียงใด โดยทางปฏิบัติควรตรวจสอบเฉพาะในเนื้อเยื่อบางส่วน เช่นปลายใบ นำไปทดสอบความสามารถในการทนเค็มจากส่วนที่เหลือใช้ต่อไป และควรจะมีการศึกษาการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอที่พบเพื่อหาอัตราส่วนของการกระจายตัว ทั้งนี้ควรมีการผสมข้ามเพื่อเพิ่มจำนวนลูกผสมให้มากพอต่อการวิเคราะห์การกระจายตัวของลูกผสมรุ่น F1 และควรมีการศึกษาการกระจายตัวต่อไปอีกในรุ่น F2 โดยการผสมกลับ (back cross) ไปยังสายพันธุ์พ่อ-แม่อีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบคุณสมบัติของข้าวสายพันธุ์ กข23TC7 และ กข23TC28 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดมาจาก somaclone โดยเปรียบเทียบอัตราการรอดตายเมื่อให้กล้าข้าวระยะ 5 ใบ อยู่ในสารละลายปุ๋ยที่เติม NaCl 0.3% เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดตายของสายพันธุ์ทนเค็มทั้ง 2 สายพันธุ์สูงกว่าสายพันธุ์หลัก คือ กข23TC7 รอดตาย 86% กข23TC28 รอดตาย 70% ขณะที่สายพันธุ์หลักรอดตาย 58%

เมื่อศึกษาการชักนำแคลลัสจากการเลี้ยงเอมบริโอของ กข23 ในอาหารสูตรที่แตกต่างกัน 5 สูตร พบว่าสูตรของ สุดารัตน์ นิติวัฒนะ (2538) เป็นสูตรอาหารที่ให้แคลลัสน้ำหนักดีที่สุดและแคลลัสที่ได้เป็น embryogenic callus ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างขององค์ประกอบสูตรอาหาร A พบว่าในส่วนของธาตุอาหารหลักมี $(NH_4)_2SO_4$ รวมอยู่ด้วย นอกนั้นยังมีส่วนของสารอินทรีย์เสริมมากมายที่สูตรอื่นไม่มี เช่น biotin กรดอะมิโนบางชนิด รวมทั้งน้ำสกัดจากมันฝรั่งด้วย

การศึกษาคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบ โดยเปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสที่รอดตายจากการเลี้ยงในอาหารที่เติม NaCl 0.5% หนึ่งสัปดาห์กับดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นกล้าที่ไม่ได้รับปัจจัยความเค็ม ใช้ UBC primer ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และใช้เทคนิค DAF ในการวิเคราะห์พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสมีรูปแบบของโพรไฟล์ดีกว่าของดีเอ็นเอที่สกัดมาจากต้นกล้า

เมื่อเปลี่ยนมาใช้ CU-primer โดยสกัดดีเอ็นเอจากต้นกล้าและใช้เทคนิค RAPD พบรูปแบบของโพรไฟล์ดีเอ็นเอมีความเฉพาะและมีแนวโน้มที่จะใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมบวกความสามารถในการทนเค็มของข้าว กข23 ได้

ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในลูกผสม(ของข้าวสายพันธุ์หลักกับสายพันธุ์ทนเค็ม) พบว่ามีแถบของดีเอ็นเอที่แตกต่างและไม่แตกต่างจากสายพันธุ์หลัก โดยพบว่า CU-primer ให้ผลดีและทำการทดลองซ้ำได้ ซึ่งใช้เทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์ โดยในไพรเมอร์ CU1 ให้แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ทนเค็ม กข23TC7 และ กข23TC28 ซึ่งต่างไปจากพันธุ์ปกติ ส่วนไพรเมอร์ CU2 สามารถวิเคราะห์ได้ในข้าว กข23TC7

ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าแถบของดีเอ็นเอของสายพันธุ์ทนเค็มที่ต่างไปจากสายพันธุ์หลัก น่าจะใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในระดับชีวโมเลกุลบ่งบอกความสามารถในการทนเค็มของข้าว กข 23 ได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ทิพยวรรณ ธนไพศาล. 2534. การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวทนเค็มที่เจริญจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรัญญา คำปัน. 2542. ปริมาณโพรลีนและน้ำตาลเมื่อข้าวอยู่ในสภาวะแล้ง และการคัดเลือกข้าวทนแล้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันชัย สังฆ์สุข. 2542. การสะสมโพรลีนและน้ำตาลของข้าวทนเค็มเมื่อได้รับสภาวะเค็มและแล้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุดารัตน์ นิติวัฒนะ. 2538. การปรับปรุงวิธีการทำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ กข23. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาพร จันทร์บัวทอง. 2541. การเลี้ยงอับเรณูข้าวเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Bajaj, Y. P. S. 1991. **Biotechnology in Agriculture and Forestry 14**. Rice Springer-Verlag,Berlin Heidelberg.pp.645.

Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primer. **BioTechnology**. 9:553-557.

Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. 1992. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. **Gen Genet**. 235:157-165.

Caetano-Anolles, G., Callahan, L. M., Williams, P. E., Weaver, K. R. and Gresshoff, P. M. 1995. DNA amplification fingerprinting analysis of bermudagrass (*Cynodon*): genetic relationships between species and interspecific crosses. **Theor Appl Genet**. 91:228-235.

Chaparro, J. X., Werner, D. J., Malley, D. O. and Sederoff, R. R. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. **Theor Appl Genet**. 87:805-815.

Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., Van den Bulcke, M., Bauw, G., Van Montagu, M. and Caplan A. 1990. Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. **The Plant Cell**. 2:19-27.

Demeke, T., Adams, R. P. and Chibbar, R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica.* **Theor Appl Genet**. 84:990-994.

Devos, K. M. and Gale, M. D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA marker in wheat. **Theor Appl Genet**. 84:567-572.

Frintsch, P., Hanson, M. A., Spore, C. D., Pack, P. E. and Rieseberg, H. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plant. **Plant Mol. Biol. Rept**. 11(1):10-20.

Godwin, I. D., Sangduen, N., Kunanuvatchaidach, R., Piperidis, G. and Adkins, S. W. 1997. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var*. indica*) somaclonal progenies. **Plant Cell Reports**. 16:320-324.

Goodwin, P. H. and Annis, S. 1991. Rapid Identification of Genetic Variation and Pathotype of *Leptosphaeria maculans* by Random Amplified Polymorphic DNA assay. **Applied and Environmental Microbiology**. 57(9):2482-2486.

Hoshida, H., Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi, Y., Tanaka, A., Takabe, T. and Takabe, T. 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant Mol. Biol**. 43:103-111.

Hurkman, W. J. and Tanaka, C. K. 1996. Effect of salt stress on Germin gene expression in Barley roots. **Plant Physiol**. 110:971-977.

Inukai,T. , Zeigler, R. S. , Sarkarung, S. , Bronson, M. , Dung, L. V. , Kinoshita, T. and Nelson, R. J. 1996. Development of pre-isogenic lines for rice blast-resistance by marker-aided selection from a recombinant inbred population. **Theor Appl Genet.** 93:560-567.

Iyer, S. and Caplan, A. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated gene in rice. **Plant Physiol**. 116:203-211.

Katiyar, S. K. , Tan, Y. , Zhang, Y. , Huang, B. , Xu, Y. , Zhao, L. , Huang, N. and Bennett, J. 1994. Identification of RAPD marker linked to the gene controlling gall midge resistance against all biotypes in China. **Rice Genetics Newsletter.** 11:128-131.

Ko, H. L., Cowan, D. C., Henry, R. J., Graham, G. C., Blakeney, A. B. and Lewin, L. G. 1994. Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **Euphytica**. 80:179-189.

Krishnamurthy, R. and Bhagwat, A. K. 1989. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. **Plant Physiol**. 91:500-504.

Lin, J. J., Kuo, J., Ma, J., Saunders, J. A., Beard, H. S., MacDonald, M. H., Kenworthy, W., Ude, G. N. and Matthews, B.F. 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping Techniques. **Plant Molec. Biol. Reptr**. 14(2):156-169.

Lowe, A. J., Hanottle, O. and Guarino, L. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Pant Genetic Resources Newsletter**. 107:50-54.

Mackill, D. J. 1995. Plant genetic resources: Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Sci**. 35:889-894.

Mileham, A. J. 1997. Identification of Microorganisms Using Random Primed PCR. **Molecular Biotechnology**. 8:139-145.

Mittal, R. and Dubey, R. S. 1990. Effect of NaCl salinity on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in germinating rice seeds differing in salt tolerance. **Indian J. Plant Physiol**. 33(1):32-39.

Moons, A., Bauw, G., Prinsen, E., Montagu, M. V. and Straeten, D. V. D. 1995. Molecular and Physiological Responses to Abscisic Acid and Salts in Roots of Salt-sensitive and Salt-Tolerant Indica Rice Varieties. **Plant Physiol**. 107:177-186.

Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polemerase chain reaction. **Scien.Am.** p.56, cited in Demeke, T., Adams, R. P. 1994. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. In Griffin, H. G. and Griffin, A. M. (eds.), **PCR Technology: Current Innovations**. pp.179-189. Boca Raton:CRC Press.

Murashige, T. and Skoog, F.1962. Arevised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physio Plant**. 15: 473-497.

Olmos, E. and Hellin, E. 1996. Mechanisms of salt tolerance in a cell line of *Pisum sativum*: biochemical and physiological aspects. **Plant Sci**. 120:37-45.

Phuangphoo, V. 1999. DNA Analysis For differentiation of the shiitake: mushroom isolates of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Master's thesis, Department of Botany, Chulalongkorn University.

Raina, S. K., Balachadran, S. M., Virmani, S. S. and Zapata, F. J. 1989. Improved medium for efficient anther culture of some indica rice hybrids. **Int. Rice. Res. Notes**. 14(3):8-9

Raina, S. K. 1993. **Double haplods from indica rice through anther culture techniques**. Biotechnology Centre, I. A. R. I. New Delhi, India. 19p.

Saghai Maroof, M. A., Yang, G. P., Zhang, Q. and Gravois, K. A. 1997. Correlation between molecular marker distance and hybrid performance in U.S. southern long grain rice. **Crop Sci**. 37:145-150.

Sambrook, J., Maniatis, T. and Frisch, E. F. 1989. **Molecular cloning : A laboratory manual.** 2nd ed. New York : Cold Spring Habor Laboratory Press.

Semal, J. 1986. **Somaclonal variations and crop improvement**. Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht. pp.277.

Suh, H. S., Sato, Y. I. and Morishima, H. 1997. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. **Theor Appl Genet**. 94:316-321.

Taiz, L. and Zeiger, E. 1991. **Plant Physiology**. 1st ed. California. The Benjamin/Cumming Publishing Company,Inc.

Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi, Y., Tanaka, A., Kishitani, S., Takabe, T., Yokota, S. and Takabe, T. 1999. Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplast. **Plant Sci**. 148:131-138.

Trigino, R. N. and Caetano-Anolles, G. 1998. Teaching methods: Laboratory exercises on DNA amplification fingerprinting for evaluating the molecular diversity of horticultural species. **Hor Technology**. 8(3):413-423.

Umeda, M., Hara, C., Matsubayashi, Y., Li, H.H., Liu, Q., Tadokoro, F., Aotsuka, S. and Uchimiya, H. 1994. Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. **Plant Mol. Biol.** 25:469-478.

Vajrabhaya, M., Supaokit, S. and . Vajrabhaya, T. 1994. A simple medium for Ochid seedling . pp82-85. **In Proceeding of the Nagoya International Orchid Show 94.** Nagoya, Japan. pp.82-85

Vajrabhaya, M., Thanapaisal, T. and Vajrabhaya, T. 1989. Development of salt tolerant lines of KDML and LPT rice cultivars through tissue culture. **Plant Cell Reports**. 8:411-414.

Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1974.Variation of *Dendrobium arising* in meristem propagation. In Proceeding of 7th . **World orchid conference**.Medelling Colombia. pp.231-243.

Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1986. On the selection of salt resistant rice from tissue culture. **In Japan-Singapore Seminar on Clonal Multiplication and Transformation of Useful Plant Through Cell and Tissue Culture.** Univ. Press. Tsukuba. Japan.

Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1987. **Final report ; New varieties of rice for saline acid soil throught tissue culture.** U.S.international development cooperation agency. Bangkok.Thailand.

Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1991. Somaclonal variation for salt tolerance in rice.In Y.P.S.Bajaj,(ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Springer-Verlage, Berlin Heidelberg , New York. 14:368-382.

Virk, S., Newbury, H. J., Jackson, M. T. and Ford-Lloyd, V. 1995. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. **Theor Appl Genet**. 90:1049-1055.

Wang, G., Castiglione, S., Zhang, J., Fu, R., Ma, J., Li, W., Sun, Y. and Sala, F.1994. Hybrid rice (*Oryza sativa* L.): identification and parentage determination by RAPD fingerprinting. **Plant Cell Reports**. 14:112-115.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res**. 18(24):7213-7218.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 18(22):6531-6535.

Winicov, I. 1996. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. **Plant Sci**. 113:105-111.

Winicov, I. and Seemann, J. R. 1990. Expression of gene for photosynthesis and the relationship to salt tolerance of Alfalfa (*Medicago sativar*) Cells. **Plant Cell Physiol**. 31(8):1155-1161.

Yamada, Y. and Okada, Y. 1991. **Plant biotechnology II**. Gendai Kagaku Soukan 20. Tokyo Kagaku Doujin Press. Tokyo. 97-107pp.

Yeo, A. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. **J. Exp. Bot**. 49(323):915-929.

Yu, L. X. and Nguyen, H. T. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). **Theor Appl Genet**. 87:668-672.

Yu, Y. L. and Lin, T. Y. 1997. Construction of Phylogenetic Tree for *Nicotiana* Species Based on RAPD Markers. **J. Plant Res**. 110:187-193.

Zhang, G. Y., Guo, Y., Chen, S. L., and Chen, S. Y. 1995a. RFLP tagging of a salt tolerance gene in rice. **Plant Sci**. 110:227-234.

Zhang, J. S. , GU, J. , Liu, F. H. and Chen, S. Y. 1995b. A gene encoding a truncated large subunit of Rubisco is transcribed and salt-inducible in rice. **Theor.Appl. Genet.** 91:361-366.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Zhang, J., Zhou, J., Zhang, C. and Chen, S. 1996. Differential gene expression in salt-tolerant rice mutant and its parental variety. **Sci. in China (Series C)**. 39(3):310-319.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายสูตรดัดแปลง WP No.2 1991

(Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณสาร (mg./l.)
Macroelements	
Potassium nitrate (KNO_3)	580
Calcium sulfate ($CaSO_4$)	500
Magnesium sulfate ($MgSO_4\ 7H_2O$)	450
Triple super phosphate ($Ca\ (H_2PO_4)_2\ H_2O$)	250
Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	100
Microelements	
di-sodium ethylene diamine tetraacetate ($Na_2EDTA\ 2H_2O$)	40
Ferrous sulfate ($FeSO_4\ 7H_2O$)	30
Manganese sulfate ($MnSO_4\ H_2O$)	15
Boric acid (H_3BO_3)	5
Zinc sulfate ($ZnSO_4\ 7H_2O$)	1.5
Potassium iodide (KI)	1.0
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4\ 2H_2O$)	0.1
Copper sulfate ($CuSO_4\ 5H_2O$)	0.05
Cobalt chloride ($CoCl_2\ 6H_2O$)	0.05

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

Stock.	ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ปริมาตรทั้งหมด	หมายเหตุ
Chloroform : Isoamylalcohol (24:1, v/v)	Chloroform Isoamylalcohol	24 ml. 1 ml.	25 ml.	
DDW	น้ำกลั่นที่ได้จากการกลั่นซ้ำ	1 ml	1000 ml	เมื่อเตรียมเสร็จนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง overnight แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
2x CTAB extraction buffer	CTAB 1 M Tris-HCl, pH 0.5 M EDTA 5 M NaCl PVP น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	4 g 20 ml 8 ml 56 ml 2 g	200 ml	ห้ามนำไป autoclave
1% CTAB precipitation buffer	CTAB 1 M Tris.Hcl, pH 8.0 0.5 M EDTA น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	1 g 5 ml 2 ml	100 ml	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Stock.	ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ปริมาตรทั้งหมด	หมายเหตุ
0.5 M EDTA, pH 8.0	1M Tris-HCl, pH 8.0 0.5 M EDTA น้ำกลั่น	10 ml 1 ml	1000 ml	เมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
50 mM EDTA	0.5M EDTA น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	100 μl	1 ml	
5 M NaCl	NaCl น้ำกลั่น	146.1 g	500 ml	เมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
1 M NaCl-TE	5 M NaCl 1 M Tris-HCl, pH 8.0 0.5 M EDTA น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	10 ml 500 m 100 μl	50 ml	
0.5 M Na_2EDTA, pH 8.0	Na_2EDTA น้ำกลั่น	186.1 g	1000 ml	ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับค่า pH เมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
2 N NaOH	NaOH น้ำกลั่น	8.0 g	100 ml	เมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
Phenol : Chloroform (1:1, v/v)	Phenol Chloroform 0.1M Tris-HCl (pH 7.6)	250 ml. 250 ml.	500 ml.	เมื่อเตรียมเสร็จแล้วเก็บในขวดสีชา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Stock.	ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ปริมาตรทั้งหมด	หมายเหตุ
20% Sarkosine	N-Lauryl sarkosyl DDW	10 g	5.0 ml	
10% SDS	SDS น้ำกลั่น	10 g	100 ml	ละลายได้ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ห้ามนำไป autoclave
3 M Sodium acetate, pH 5.2	$CH_3COONa.3H_2O$ น้ำกลั่น	40.827 g	100 ml	ใช้กรดอะซิติกในการปรับค่า pH เมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
1M Tris-HCl, pH 8.0	Tris น้ำกลั่น	121.1 g	1000 ml	ใช้ conc. HCL ในการปรับค่า pH เมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสและ%GC content ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Primer	Sequence(5'→3')	%GC content
101	GCGCCTGGAG	80
174	AACGGGCAGC	70
228	GCTGGGCCGA	80
268	AGGCCGCTTA	60
273	AATGTCGCCA	50
299	TGTCAGCGGT	60
428	GGCTGCGGTA	70
456	GCGGAGGTCC	80
457	CGACGCCCTG	80
459	GCGTCGAGGG	80

Primer	Sequence(5'→3')	%GC content
CU1	GTTTCGCTCC	60
CU2	CCACAGCAGT	60
CU3	AGTGCAGCCA	60
CU4	AACGGCGACA	60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

องค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงแคลลัสจากเอมบริโอของข้าว

องค์ประกอบ	สูตรอาหารเลี้ยงแคลลัส (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	A	CU	M-019	SK-1	Y
ธาตุอาหารหลัก					
KNO_3	2,830	1,900	3,134	3,150	1,900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	166	440	440	150	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185	370	370	185	370
KH_2PO_4	400	170	54	540	170
$(NH_4)_2SO_4$	463	-	320	-	-
ธาตุอาหารรอง					
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10	22.3	22.3	22.3	22.3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10	8.6	8.6	10	8.6
KI	0.80	0.83	0.8	1.0	0.83
H_3BO_3	10	6.2	6.2	6.0	6.2
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.025	0.25	0.25	0.25	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.025	0.025	-	0.025
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	19.857	27.8	27.8	37.25	77.84
$NaEDTA \cdot 2H_2O$	26.642	37.3	37.3	27.85	37.3
สารอินทรีย์อื่นๆ					
วิตามิน					
Myo-inositol	200	-	100	100	-
Nicotinic acid	1.0	0.5	-	2.5	0.5
Pyridoxine HCl	1.0	0.5	2.0	2.5	0.5
Thiamine HCl	5.0	0.1	2.0	2.5	1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงแคลลัสจากเอมบริโอของข้าว (ต่อ)

องค์ประกอบ	สูตรอาหารเลี้ยงแคลลัส (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	A	CU	M-019	SK-1	Y
สารอินทรีย์อื่นๆ					
วิตามิน					
Biotin	0.5	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	200
กรดอะมิโน					
Glycine	2.0	-	2.0	2.0	-
Proline	40	-	-	-	-
Arginine	40	-	-	-	-
Asparagine	40	-	-	-	-
Alanine	40	-	-	-	-
Glutamine	40	-	-	-	-
สารควบคุมการเจริญ					
2,4-D	0.8	2.0	2.0	0.75	2.2
NAA	-	-	-	2.5	-
BAP	0.4	-	-	-	-
Kinetin	-	0.3	0.5	0.75	-
สารอินทรีย์เสริม					
Yeast Extract	-	-	-	-	5,000
น้ำสกัดมันฝรั่ง	100,000	-	-	-	-
น้ำมะพร้าวอ่อน (ml/l)	100	100	-	-	-
Sucrose	32,000	20,000	-	30,000	30,000
Maltose	-	-	50,000	-	-
Casein hydrolysate	-	-	-	500	-
Agar	8,000	6,000	-	8,000	8,000
PH	5.6	5.8	5.8	5.8	5.8

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิจิตรา สมรรคนัฏ เกิดวันที่ 24 สิงหาคม พ.ศ.2518 ที่อำเภอตลิ่งชัน จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาพืชไร่-นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ปี พ.ศ.2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2540 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย