บทที่ 3
วิธีการศึกษา

ขั้นตอนการศึกษาความเสี่ยงของการไหลเวียนของยีนจากพืชจำลองพันธุ์ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1. **การนำเทคนิคการตรวจสอบพืชจำลองพันธุ์มาประยุกต์ใช้โดยการปรับสารเคมีให้อยู่ในรูปชุดตรวจสอบอย่างง่าย**

วัสดุและอุปกรณ์

- ซอฟต์แวร์ DNasis (Hitachi software Engineering)
- Software Oligo 4 และระบบปฏิบัติการ Macintosh

สารเคมี

สารเคมีสำหรับสร้างชุดตรวจสอบ Amplification Core kit

- 10X buffer
- Magnisium chloride
- Taq DNA polymerase enzyme
- dNTP 10 mM

สารเคมีในการ run gel

- TAE buffer
- Agarose ME
- EtBr 10 mg/ml
- Loading dye 6x
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

นำเทคนิคการตรวจสอบพืชจำลองพันธุ์ที่รายงานโดย ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ (2543) มาประยุกต์ใช้โดยทำการศึกษาเพิ่มเติมดังนี้

1.1 ตรวจสอบข้อมูลเบื้องต้นที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของยีนที่พบในพืชจำลองพันธุ์ และลักษณะของพืชพันธุ์ในประเทศ เพื่อวางแผนวิธีการตรวจสอบพืชจำลองพันธุ์ในระบบตรวจสอบข้อมูลพืชจำลองพันธุ์ที่สร้างขึ้น ชนิดของยีนควบคุมและยีนเป้าหมายในพืชจำลองพันธุ์ต่างๆ รวมถึงพืชจำลองพันธุ์ที่มีการอนุญาตปลูกทดสอบภายในประเทศตรวจสอบข้อมูลพืชปลูก โอกาสในการปนพันธุ์ ผลกระทบที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเชื้อ CaMV ในธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าคู่ไพรเมอร์เฉพาะที่นำมาใช้สามารถใช้ในการตรวจสอบ

พืชจำลองพันธุ์และติดตามการไหลเวียนของยีนจากพืชจำลองพันธุ์ได้อย่างถูกต้องและไม่ใช่เกิดจากการปนของชิ้นส่วนบริเวณดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบจากแหล่งธรรมชาติ

1.1.1 ศึกษาความเหมือนของลำดับเบส (homology) บนพื้นฐานของ ฐานข้อมูลดีเอ็นเอและข้อมูลจากสิทธิบัตร เพื่อตรวจสอบบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะ สืบค้นข้อมูล 35S โปรโมเตอร์ที่ใช้ในการสร้างถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ผ่านทางฐานข้อมูลที่พบใน Genebank และข้อมูลถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ที่ได้จาก Patent search โดยนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNasis (Hitachi Software Engineering) ซอฟต์แวร์ Oligo 4 และระบบปฏิบัติการ Macintoshโดยอาศัยหลักการดังนี้

1. target product ต้องมีขนาดเล็กกว่า 200 bp เพื่อให้สะดวก ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ
2. คู่ primer ที่ออกแบบได้ ไม่ก่อให้เกิดการจับตัวกันเอง และมีสัดส่วนของ GC content ที่เหมาะสม

1.2 เตรียมชุดน้ำยาให้อยู่ในรูปชุดตรวจอย่างง่ายซึ่งประกอบด้วยชุด core kit และชุดเอ็นไซม์ ชุดคิด 1 ชุด มี 20 reaction เตรียมได้จากส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

1.2.1 ชุด core kit สำหรับ 20 reaction มีปริมาตร 372.75 µl ประกอบด้วย

ความเข้มข้นของสารที่ใช้เตรียม	ชนิดสารเคมี	ปริมาณที่ใช้ µl
100%	DW	267.75
10x	buffer	110
10 mM	dNTP	10.5
25 mM	$MgCl_2$	31.5
10 pmole	3' primer	10.5
10 pmole	5' primer	10.5

หมายเหตุ ปริมาตรชุดสุทธิของ core kit 1ชุด ที่เป็น 440.75 µl เป็นการเผื่อไว้สำหรับความผิดพลาดของเครื่องมือเวลาดูด core kit ไปใช้สำหรับปริมาตรที่ใช้จริง = 355 µl ต่อ 20 reaction

1.2.2 ชุดเอ็นไซม์ *Taq* polymerase ความเข้มข้น 5 unit / µl จำนวน 5.5 µl ต่อ 20 reaction (หมายเหตุ ปริมาตรชุดสุทธิของ เอ็นไซม์ *Taq* polymerase 1ชุด = 5.5 µl เป็นการเผื่อไว้อีก 1 หลอด สำหรับความผิดพลาดของเครื่องมือเวลาดูดเอ็นไซม์ *Taq* polymerase ไปใช้ สำหรับปริมาตรที่ใช้จริง = 5.0 µl ต่อ 20 reaction)

1.3 ทำการทดสอบประสิทธิภาพและการใช้งานของชุดตรวจสอบที่เตรียมได้ โดยนำชุดตรวจสอบที่เตรียมได้ไปทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐานจากถั่วเหลืองจำลองพันธุ์และดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแหล่งต่างๆ รายระเอียดการใช้ชุดคิดเป็นดังนี้

- การเก็บชุดคิดให้เก็บที่ -20°C
- การผสมปฏิกิริยาขนาดใช้งานโดยดูด Core kit ด้วยปริมาตรเท่ากับจำนวนหลอด x 17.75 microlitre และดูดเอ็นไซม์ *Taq* ด้วยปริมาตรเท่ากับ จำนวนหลอด x 0.25 microlitre ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตแยกลงในหลอด PCR ขนาด 600 microlitre หลอดละ 18 microlitre ใช้ DNA templet จำนวน 2 microlitre/ 1 หลอดปฏิกิริยา

  ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

Denaturation	93°C	60 วินาที
Annealing	50°C	90 วินาที
Extension	72 °C	180 วินาที

ทำซ้ำ 50 รอบ

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาโดยวิเคราะห์บนแผ่นเจลด้วยเทคนิค Electrophoresis แล้วส่องดูใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง

2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการปนพันธุ์ถั่วเหลืองจำลองพันธุ์สู่ระบบการผลิต โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 ตรวจสอบเมล็ดถั่วเหลืองที่ใช้บริโภค ที่เก็บตัวอย่างได้ในท้องตลาด

2.1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองในท้องตลาด

2.1.2 ตรวจสอบอัตราการงอกของถั่วเหลือง ดังนี้

นำเมล็ดถั่วเหลืองตัวอย่าง แช่น้ำสะอาด 6-8 ชั่วโมง เพาะลงบนถาดเพาะขนาด 6 x 12 หลุม ที่มีวัสดุเพาะชำที่มีอัตราส่วน ขุยมะพร้าว ขี้เถ้าแกลบ และดิน อย่างละ 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน แล้วกลบด้วยวัสดุเพาะลงให้พอดีกับปากหลุม รดน้ำให้ชื้นอยู่ตลอดเวลาเป็นเวลา 7 วัน รอดูจำนวนเมล็ดที่งอกบันทึกผล คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของถั่วเหลือง โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอก} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่ใช้ในการเพาะ}} \times 100$$

ตรวจซ้ำหลังจากเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 6 เดือนหลัง

2.1.3 ตรวจสอบการปะปนพันธุ์ถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ในตัวอย่าง

2.2 สำรวจข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและวิธีการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์พื้นเมือง และเก็บตัวอย่างถั่วเหลืองในแหล่งผลิตในเขตพื้นที่ศึกษา

2.2.1 สำรวจแหล่งที่มาที่ไปของเมล็ดพันธุ์ ค้นหาแปลงถั่วเหลืองจำลองพันธุ์จากข้อมูลการศึกษาการปนเปื้อนของถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ในท้องที่ต่างๆในเขตจังหวัดที่ทำการศึกษา ที่ตรวจพบจำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อนสูง ประกอบกับการสอบถามเกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลือง และเจ้าของร้านรับซื้อผลผลิตถั่วเหลืองในพื้นที่ หาแปลงปลูกถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ที่มีอยู่แล้วมาใช้ในการศึกษา

2.2.2 สำรวจข้อมูล ชนิดพืชปลูกและวัชพืชในแปลงปลูกเก็บรวบรวมข้อมูลของถั่วเหลืองในเขตพื้นที่ศึกษาโดยการสอบถามข้อมูลจากเจ้าหน้าที่ของรัฐในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการปลูกถั่วเหลืองในพื้นที่ เกษตรกร ผู้รวบรวมและค้าเมล็ดพันธุ์ ผู้ประกอบการรถรับจ้างสีเปลือกถั่วเหลือง ผู้นำชุมชน และกรมวิชาการเกษตร เก็บข้อมูลของพื้นที่แปลงปลูกถั่วเหลืองในข้อ 2.2.1 (แปลงดังกล่าว)

ภาพที่ 4 แสดงภูมิประเทศบริเวณโดยรอบแปลงปลูกถั่วเหลือง ในจังหวัดเชียงใหม่ (24 กันยายน 2543)

2.2.3 ตรวจสอบอัตราการงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ ที่ได้จากเกษตรกรเจ้าของแปลงในข้อ 2.2.1 โดยวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.1.2

2.2.4 ตรวจสอบอัตราการปนพันธุ์จากแปลงเกษตรกร โดยใช้โมเดลทดสอบการปนพันธุ์ระหว่างถั่วเหลืองต่างพันธุ์ โดยอาศัยความแตกต่างของสีดอกในการติดตามดังนี้

1.ใช้ความแตกต่างของสีดอกถั่วเหลืองระหว่างกลุ่มพันธุ์ดอกสีขาว (เช่น พันธุ์เชียงใหม่ 60) และพันธุ์ดอกสีม่วง (เช่น พันธุ์สุโขทัย1, พันธุ์สจ.) เก็บรวบรวมข้อมูลสภาพแวดล้อม และวิธีการเขตกรรมของเกษตรกร เช่น แหล่งที่มาของเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูก การใช้ประโยชน์จากผลผลิตถั่วเหลือง สภาพทั่วไปของแปลง ข้อมูลพืชที่ปลูกในแปลงข้างเคียง

2.เก็บข้อมูลในขณะต้นถั่วเหลืองออกดอกโดยวิธีสุ่ม โดยแบ่งแปลงปลูกออกเป็นแปลงย่อยๆขนาด 2x2 ตารางเมตร ให้หมายเลขแต่ละแปลงย่อยเรียงลำดับกันไป ใช้ตารางเลขสุ่มในการสุ่มเลือกหมายเลขแปลงย่อยที่จะใช้ในการเก็บข้อมูลตัวอย่าง นับจำนวนต้นที่ดอกสีขาว และต้นดอกสีม่วงที่พบในแต่ละ แปลงย่อย ทำทั้งหมด 30 แปลงย่อย

3.วิเคราะห์ผลการสำรวจ

2.2.5 ตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ด้วยขั้นตอนดังนี้

1. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยวิธี วิซาร์ด เรซิน (Wizard ®) (Promega) ด้วยวัสดุและอุปกรณ์และวิธีการ ดังต่อไปนี้

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

1. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัด (extraction buffer) ประกอบด้วยสารละลาย 4 ชนิด ที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้

10 mM	Tris-HCl pH 8.0
150 mM	NaCl
2 mM	EDTA
1%	SDS

2. สารละลาย 5 M Guanidine HCl
3. เอ็นไซม์ proteinase K (20 mg/ml)
4. Shaking hot air incubator
5. Microcentrifuge
6. Syringe ขนาด 3 ml
7. Manifold (Vac-man™)
8. DNA column (Wizard™ minicolumn)
9. Resin (Wizard™ resin)
10. 80% isopropanol

11. ตราชั่งละเอียด
12. หลอด microcentrifuge tube 2 ml ชนิดมีฝาปิดและไม่มีฝาปิด
13. หลอด microcentrifuge tube 1.5 ml
14. เครื่องปั่นบด

วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

1. บดตัวอย่างถั่วเหลืองให้เป็นผงละเอียดเนื้อเดียวกัน สุ่มชั่งตัวอย่าง 300 mg ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัด 860 μl สารละลาย 5 M Guanidine HCl 100μl ผสมให้เข้ากัน และเติมเอ็นไซม์ Proteinase K 40 μl ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง
3. บ่มปฏิกริยาที่ 56 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ปฏิกริยาผสมเข้ากันตลอดเวลา โดยใช้ shaking incubator
4. นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นแยกที่อุณหภูมิต่ำ (4 °C) ด้วยความเร็ว 14500 รอบเป็นเวลา 15 นาที
5. จับดีเอ็นเอในสารละลายที่สกัดได้ด้วยเรซินสังเคราะห์ดังนี้
    5.1 จัด column และ Syringe ขนาด 3ml ให้เข้าชุด โดยวาง column ให้สนิทบน manifolds จากนั้นจึงนำหลอด Syringe ที่ดึงแกนหลอดออกวางบน column อีกต่อหนึ่ง ตรวจสอบให้วาล์วของ manifolds อยู่ในตำแหน่งปิด ขั้นตอนนี้ต้องระวังมิให้แกนหลอด Syringe ปนเปื้อนเขียนชื่อตัวอย่างกำกับให้ชัดเจน
    5.2 เติมสารละลายเรซินสังเคราะห์ที่เขย่าให้เข้ากันดีแล้วลงสู่ Syringe ที่เตรียมไว้หลอดละ 1 ml
    5.3 นำ supernatant ที่ได้จากข้อ 4 จำนวน 400 μ มาผสมรวมกับละลายเรซินที่เตรียมไว้ในข้อ 5.2 ให้ตรงตามที่ได้เขียนชื่อกำกับ ผสมให้เข้ากัน
    5.4 เปิดวาล์วของ manifolds ให้อยู่ในตำแหน่งเปิด และเพิ่มแรงดันโดยเสียบแกนหลอดและกดช้าๆ หรือใช้แรงดูดจากปั๊ม เพื่อดึงให้สารผสมเข้าสู่ column
    5.5 เมื่อสารผสมเข้าสู่ column จนหมดให้ล้าง column โดยการเติมสารละลาย 80% isopropanal 2 ml เพิ่มแรงดันหรือแรงดูดจากปั๊มอีกครั้งจนสารละลายเข้าไปล้าง column จนหมด

5.6 นำ column ที่ได้มาวางบนหลอด microcentrifuge tube ขนาด 2 ml ที่ไม่มีฝาปิด ปั่นให้แห้งโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

5.7 ย้าย column ลงบนหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่ปลอดเชื้อ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่บ่มไว้ที่ 70 ^{0}C 100 μ l เข้าสู่ column ปล่อยไว้ 1 นาที แล้วทำการปั่นเอาสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการออกโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

5.8 นำดีเอ็นเอของถั่วเหลืองตัวอย่างที่ได้ไปทดสอบโดยวิธี PCR โดยใช้ชุดตรวจสอบที่ประยุกต์ขึ้น จากนั้นนำผลผลิตของ PCR ที่ได้มาตรวจสอบโดยการทำ Electrophoresis ดูผลบนเครื่องฉายแสง Ultra-violet บันทึกผล

2.2.6 เปรียบเทียบข้อมูลทั่วไปและข้อมูลการเจริญเติบโต ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ปกติและถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ ศึกษาเปรียบเทียบจากแปลงที่หาได้ในข้อ 2.2.1 โดยมีการจัดการแปลงปลูกถั่วทั้ง 2 พันธุ์ ในลักษณะเดียวกัน คือกำจัดวัชพืชโดยการถอนออกทุกสัปดาห์ ส่วนในแปลงถั่วจำลองพันธุ์ไม่กำจัดวัชพืช ไม่ฉีดยากำจัดศัตรูพืช และทั้ง 2 แปลงไม่ใส่ปุ๋ยเคมีในแปลงปลูก วัดการเจริญเติบโตของต้นถั่ว ผลผลิต ตลอดจนปริมาณการเกิดปมรากของต้นถั่วเหลืองตัวอย่าง เก็บผลผลิตแยกแต่ละหมายเลขของแต่ละพันธุ์ในแต่ละแปลง บันทึกการเจริญเติบโต เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงและผลผลิตที่ได้ระหว่างถั่วเหลือง 2 พันธุ์ดังกล่าว และเปรียบเทียบกับข้อมูลจากเกษตรกรด้วยวิธี Unpaired T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และตรวจสอบความสัมพันธุ์ของพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 กับการเกิดปมรากของไรโซเบียมในพื้นที่ปลูกจังหวัดเชียงใหม่ ด้วยวิธี Chi^2 - Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ความเป็นไปได้ของการเกิดการถ่ายทอดยีน

ตรวจสอบความเป็นไปได้ของการเกิดการถ่ายทอดยีนจากถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ไปยังสิ่งมีชีวิตอื่นดังนี้

3.1 ตรวจสอบความเป็นไปได้ในการไหลเวียนของยีนผ่านทางการถ่ายละอองเรณูดังนี้

3.1.1 ศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณูโดยวิธีดังต่อไปนี้

1) เลือกดอกถั่วเหลืองใกล้บานเป็นวัสดุทดลอง

2) หยด Glycerol ลงบน slide สะอาดที่เตรียมไว้ 1 slide ต่อ 1 ดอก

3) นำ Forceps ดึงกลีบดอกถั่วเหลืองออก นำดอกถั่วเหลืองจิ้มลงในหยดglycerol ใช้เข็มเขี่ยกลุ่มละอองเรณูให้กระจายทั่วกันบนแผ่น slide

4) เตรียม Slide เปล่า ติดฉลากจำนวนเวลา จำนวน 56 slide แบ่งเป็น 2 ชุด ชุดละ 23 slide ต่อ 1 ดอก

ชุดที่ 1 ติดฉลากจำนวนชั่วโมง 0,1,3,5.....,53

ชุดที่ 2 ติดฉลากจำนวนชั่วโมง 0,2,4,6,.....,54

5) นำ Loop ไปแตะส่วนผสมในข้อที่ 3 ถ่ายลงใน slide ที่เตรียมไว้

6) จับเวลาตามจำนวนชั่วโมงที่กำหนด และทำการย้อมละอองเรณูด้วยสีย้อม Airborne pollen ที่มีชื่อว่า Calberla solution ตามเวลาที่ติดไว้ในฉลาก โดยละอองเรณูที่มีชีวิตจะติดสีชมพู ส่วนที่ตายแล้ว จะเห็นละอองเรณูติดสีน้ำตาล

3.1.2 ศึกษาระยะทางและการเคลื่อนที่ของละอองเรณู ที่ระยะต่างๆดังนี้ 0, 25, 50, 75, 100, 125 เมตร โดย

1) ใช้ตะเกียบไม้ไผ่ผ่าปลายด้านบนลงมา 1 นิ้ว

2) ทา Glycerol ลงบน slide ด้านหนึ่งให้ทั่ว ติด label ระยะห่างจากแปลงถั่วเหลืองไว้อีกด้านหนึ่ง เสียบตรงร่องตะเกียบไม้ไผ่ที่เสียบไว้

3) นำไปปักตามระยะทางต่างๆ ที่กำหนด จากแปลงถั่วเหลืองในทิศทางตามแนวลมพัด

4) ตรวจนับละอองเรณูถั่วเหลืองที่ติดอยู่บน Slide เปรียบเทียบกับ slide มาตรฐานละอองเรณูถั่วเหลือง

3.2 ตรวจสอบความเป็นไปได้ในการถ่ายยีนออกสู่สิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ

3.2.1 ตรวจสอบการไหลเวียนของยีนจากพืชจำลองพันธุ์ไปสู่พืชและวัชพืชตระกูลเดียวกัน

1.ตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่เกษตรกรใช้ปลูกในแปลงศึกษา ทั้งพันธุ์ สจ.5 และถั่งเหลืองจำลองพันธุ์ โดยการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธี วิซาร์ด เรซิน Wizard ® Minipreps DNA Purification (Promega) และตรวจสอบโดยการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ 35S โปรโมเตอร์ด้วย PCR ผลผลิตจากปฏิกิริยานำมาแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าคงที่ ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis เทียบกับ 100 base pair ladder เปรียบเทียบระหว่าง ถั่วจำลองพันธุ์ และถั่วพันธุ์มาตรฐาน (Non-GMOs)

2.ตรวจสอบต้นถั่วเหลืองที่เลือกใช้ในการเก็บข้อมูลที่เกษตรกรใช้ปลูกในแปลงศึกษาทั้งถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ และพันธุ์ สจ.5 ที่อยู่ในแปลงข้างเคียงห่างกันในระยะ 0-25 เมตร พันธุ์ละ 30 ต้น รวมทั้งวัชพืชที่เป็นพืชตระกูลถั่ว ที่ขึ้นอยู่ในแปลงถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ เพื่อการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนหรือลำต้นด้วยวิธี CTAB และตรวจสอบโดยการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ 35S โปรโมเตอร์ด้วย PCR ผลผลิตจากปฏิกิริยานำมาแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าคงที่ ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis เทียบกับ 100 base pair ladder เปรียบเทียบระหว่างถั่วจำลองพันธุ์และถั่วพันธุ์มาตรฐาน (Non-GMOs) เพื่อให้แน่ใจว่าถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ เป็นพืชจำลองพันธุ์จริงและถั่วเหลืองพันธุ์พันธุ์ สจ. 5และวัชพืชตระกูลถั่วที่จะนำมาใช้ในการศึกษาเป็นพืชธรรมชาติ (Non-GMOs)

3.ตรวจสอบการไหลเวียนของยีนจากถั่วจำลองพันธุ์ไปสู่ถั่วเหลือง สจ.5 ที่เกิดจากการผสมข้ามต้นและทำการตรวจสอบการถ่ายยีนไปสู่วัชพืชตระกูลถั่วโดยการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธี วิซาร์ด เรซิน Wizard ® Minipreps DNA Purification (Promega) และตรวจสอบโดยการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ 35S โปรโมเตอร์ด้วย PCR ผลผลิตจากปฏิกิริยานำมาแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าคงที่ ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis บันทึกผลการตรวจ

3.2.2 ตรวจสอบการไหลเวียนของยีนจากพืชจำลองพันธุ์ไปสู่จุลชีพ ดังนี้

1. เพาะเลี้ยงจุลชีพในดิน บริเวณรอบๆ รากของต้นถั่วเหลืองโดยนำดินรอบรากถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 และถั่วเหลืองพันธุ์จำลองพันธุ์จำนวน 1 กรัม มาใส่น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 ml เขย่าให้เข้ากัน ดูดสารละลายดินดังกล่าวมา 100 µl เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Nutrient broth เป็นเวลา 16 ชม.

2. ตรวจสอบชนิดของจุลชีพโดยเทคนิค Streak plate

3. ตรวจวิเคราะห์จุลชีพโดยการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธี วิซาร์ด เรซิน (Promega) และตรวจสอบโดยการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ 35S โปรโมเตอร์ด้วย PCR ผลผลิตจากปฏิกิริยานำมาแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าคงที่ ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

3.2.3 ตรวจสอบการไหลเวียนของยีนจากพืชจำลองพันธุ์ไปสู่แบคทีเรียในปมรากดังนี้

1. ขณะที่ต้นถั่วออกดอกสุ่มขุดต้นถั่วจากแปลงที่เป็นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 และ ถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ มาศึกษาการเกิดปมรากไรโซเบียม แปลงละ 5 ต้นบันทึกผลและตรวจชนิดพืชตระกูลถั่วที่พบในแปลงถั่วเหลืองจำลองพันธุ์

2. นำปมรากถั่วและวัชพืชตระกูลถั่วทั้ง 2 แปลงมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น โดยตัดรากทิ้งสายแล้วจึงแยกปมของแต่ละต้น
3. ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อก 2% ผสม Tween 1-2 หยด นาน 5 นาที
4. ล้างน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ล้างต่อด้วย 70% EtOH นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นซ้ำอีก 2 ครั้ง
5. นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว YMA Congo Red Media 7-14 วัน ตามชนิด ไรโซเบียมที่ขึ้นกับชนิดพืชตระกูลถั่ว (มัยราบ 7 วัน,ถั่วลิสงและถั่วเหลือง 14 วัน) นำขึ้นวางบนอาหาร Congo red agar ดูว่ามีการปนเปื้อนเนื้อเยื่อหรือไม่ ถ้ามีกลับไปเริ่มที่ข้อ 4 ใหม่ จนกว่าจะหมดการปนเปื้อน
6. ตัดปมรากออกเป็นชิ้นบางใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร YM Congo Red (เหลว) 10 ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เก็บเซลล์ ไรโซเบียม โดยการ Centrifuge ทำการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธี เรซิน วิซาร์ด Wizard ® Minipreps DNA Purification (Promega) และตรวจสอบโดยการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ 35S โปรโมเตอร์ด้วย PCR ผลผลิตจากปฏิกิริยานำมาแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าคงที่ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

3.2.4 ตรวจสอบการไหลเวียนของยีนจากพืชจำลองพันธุ์ไปสู่จุลชีพในทางเดินอาหารของแมลง และแมลงผสมเกสร และผลกระทบต่อเซลล์ลำไส้แมลงผึ้งโพรงไทยด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

3.2.4.1 ผลต่อผึ้งที่บริโภคถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ ในสภาพทดลอง

1. เลี้ยงผึ้งโพรง 2 กลุ่ม กลุ่มแรกให้ทานแป้งถั่วเหลืองพันธุ์มาตรฐาน ผสมน้ำผึ้งบริสุทธิ์เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 ให้ทานแป้งถั่วเหลืองจำลองพันธุ์ผสมน้ำผึ้งบริสุทธิ์เป็นชุดทดสอบ
2. เลี้ยงไปเป็นเวลาหนึ่งเดือน จึงเริ่มเก็บแมลงมาตัดลำไส้ เพื่อเพาะเลี้ยงจุลชีพในลำไส้ผึ้ง
3. นำชิ้นส่วนลำไส้มาเลี้ยงในอาหาร LB เหลว โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่คัดเลือกให้อาหารที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin กับกลุ่มปกติ
4. เก็บเซลล์ด้วยวิธี Centrifuge
5. สกัด DNA ตรวจการไหลเวียนของยีนโดยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลทาง Gel electrophoresis

6. นำผึ้งทั้ง 2 รังที่เลี้ยงมานาน 4 เดือนมาตรวจสอบสภาพลำไส้ โดยการเตรียมตัวอย่างในพาราฟิน ผสมด้วย Acid Haemalaum แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เทคนิคการเตรียมตัวอย่างทำดังนี้

1).นำตัวอย่างลำไส้และกระเพาะอาหารของผึ้งมาตรึงในสารละลาย 10% formaldehyde

2).ดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยการแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ (Ethanol) 80%, 90%, 95% และ100% 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ตามลำดับ แล้วแช่ตัวอย่างในสารละลายไซลีน (Xylene) ครั้งละ 15 นาที

3).นำตัวอย่างบรรจุใส่สารละลายพาราฟินที่หลอมละลายที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส

4). ลดอุณหภูมิจนถึงอุณหภูมิห้อง

5). ตัด Section ด้วย Microtome และนำแผ่นตัวอย่างที่ทำ Section ได้วางบนแผ่นสไลด์

6). สกัดพาราฟินออกโดย แช่ในสารละลาย ไซลิน 2 ครั้ง และแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ 100% 100% 90% 80% 70% ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ

7). ผสมสีดังนี้ สารละลาย Heametoxylin แบบ Acid Haemalaum 3-5 นาที และ 1% Eosin 3-5 นาที ก่อนแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ 100% 100% 90% 80% 70% ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกผล

3.2.4.2 ผลต่อแมลงในกลุ่มผสมเกสรที่เกี่ยวข้องกับละอองเรณู และน้ำหวานจากดอกของถั่วเหลือง จำลองพันธุ์ ในสภาพธรรมชาติ

1. นำแมลงที่จับในระหว่างการทดลอง(ตามที่ระบุไว้ขั้นต้น)มาตรวจสอบดูละอองเรณูที่ติดอยู่
2. นำแมลงจาก ข้อ 1 มาตัด Section ผ่าเอาลำไส้มาจัดเรียงในอาหาร LB เหลว ประมาณ 16 ชม.ทำการ Centrifuge เก็บเซลล์ มาตรวจและวิเคราะห์การไหลเวียนของยีน โดยการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธีวิซาร์ดเรซิน Wizard ® (Promega) และตรวจสอบโดยการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ 35S โปรโมเตอร์ด้วย PCR ผลผลิตจากปฏิกิริยานำมาแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าคงที่ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

3.2.5 **เสถียรภาพของดีเอ็นเอในชุดดินต่าง ๆของประเทศ**

การตรวจสอบเสถียรภาพของดีเอ็นเอในชุดดินต่างๆของประเทศ มีวัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษาดังนี้

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. ชุดดินกำแพงแสน
2. ชุดดินทรายมาบบอน
3. ชุดดินรังสิต
4. ชุดดินวาริน
5. ชุดดินชัยบาดาล
6. Plasmid pCAMBIA 1301 จากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciences* เป็นดีเอนเอมาตรฐาน ในการทดสอบกับชุดดิน 5 ชุด

<u>วิธีการทดลอง</u>

ขั้นตอนการเตรียม Plasmid pCAMBIA 1301 จากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciences*

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciences* ที่มี plasmid pCAMBIA 1301 จาก Glycerol Stock ในอาหารเหลว LB + kanamycin 20 ppm ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
2. สกัดพลาสมิต pCAMBIA 1301 จากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciences* โดยรวบรวมแบคทีเรียที่ได้ในข้อ 1 ย้ายลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นด้วยความเร็วสูง นาน 5 นาที ทิ้งของเหลวส่วนบน เก็บ pellet เชื้อที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอด ทำการการสกัด plasmid pCAMBIA 1301 โดยการย่อยสลายเซลล์ด้วย Lysozyme buffer 200 µl ทำให้เซลล์แตกโดยการเติม alkaline Solution จำนวน 400 µl ปรับสภาพสารละลายเป็นกลางโดยการเติม KOAc จำนวน 300 µl แล้วนำไปวางบนน้ำแข็ง 10 นาที จะมีตะกอนสีขาวขุ่นจะค่อยเกิดขึ้น นำไปปั่นเก็บตะกอนดีเอนเอที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ทิ้งตะกอน เก็บสารละลายส่วนบนมาทำการสกัดด้วย phenol Choroform 1 ครั้ง ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ทิ้งตะกอน เก็บสารละลายส่วนบนมาตกตะกอนดีเอนเอด้วย Iso-propanal 600 µl จะเกิดตะกอน DNAแขวนลอย อยู่ใน

สารละลาย นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ทิ้งสารละลายส่วนบนเก็บตะกอน DNA มาล้างด้วย 70% EtOH 1ml ปั่นที่ความเร็วรอบ 80% ของความเร็วสูงสุด ทิ้งสารละลายส่วนบน เก็บ pellet ตะกอน DNA ไปทำให้แห้งใน thermal centrifuge ที่อุณหภูมิ 45 องศา นาน 10-15 นาที เพื่อกำจัด EtOH ที่ค้างอยู่ ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer 20-30 μl เก็บสารละลายดังกล่าวที่ –20 องศาเซลเซียส

<u>ขั้นตอนการการตรวจสอบเสถียรภาพของดีเอ็นเอในชุดดิน ทั้ง 5</u>

1. บรรจุดินตัวอย่างทั้ง 5 ชุด ใส่ในกระถางขนาด 5 นิ้ว กระถางละ 1 กิโลกรัม ชุดดินละ 4 กระถาง
2. แบ่งสารละลาย plasmid pCAMBIA 1301 ใส่ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml หลอดละ 3 μl จำนวน 15 หลอด เติมน้ำ DW ลงไปหลอดละ47 μl
3. รด plasmid pCAMBIA 1301 ลงในชุดดินแต่ละชุดจำนวนชุดดินละ 3 กระถาง โดยจะมีชุดควบคุมที่ไม่รด plasmid pCAMBIA จำนวนชุดดินละ 1 กระถาง
4. รดน้ำกลั่นจำนวน 30 ml ทุกวันในตอนเช้า
5. เก็บตัวอย่างดินทุก 7 วัน เริ่มตั้งแต่วันที่ รด plasmid pCAMBIA 1301 ลงในดิน จนครบระยะเวลา140 วัน
6. สกัดดีเอ็นเอจากดินด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Clegg, C. Dและคณะ1997 ดังนี้

   1) ชั่งเนื้อดิน 500 มิลิกรัม เติมผง Polyvinylpyrolidone (PVPP) 200 มิลิกรัม และเติม 3 มิลิลิตร ของ Phosphate Buffer pH8.0 ที่ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ 150 mM EDTA 100 mM ใน Phosphate Buffer ที่มี 1% SDS

   2) บ่มตัวอย่างดินจากข้อ1 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา1ชั่วโมง

   3) ตกตะกอน DNA ด้วย Polyethylene Glycol (PEG) 6000 ที่ความเข้มข้น 15% ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

   4) ปั่นรวบรวมตะกอน DNA และละลายใน TE และนำ DNA ที่ได้ไปตรวจการคงตัวของ 35S Promoter Element ต่อไปด้วยเทคนิค PCR