บทที่ 2
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. พืชทดลอง

เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* Linn.) กลุ่ม *indica* สายพันธุ์ต่าง ๆที่คัดเลือกมาแล้วดังนี้

1.1 เมล็ดรุ่น M_1 (*Oryza sativa* Linn.) ที่ผ่านการให้สารที่มีผลลดการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่เบส cytosine ด้วย analog ของ cytidine คือ 5-azacytidine 25 μM ในสภาพ *in vitro* เป็นเวลา 20 วัน ซึ่งคัดเลือกโดย ทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536) ดังนี้

พันธุ์, สายพันธุ์	**ลักษณะ***	**ความสูง(ซม.)/ จำนวนยอด**
พันธุ์เหลืองประทิว123		
LPT123 A10DB	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	95/ 23
LPT123 A15DB	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	96/ 31
LPT123 A13D	ต้นเตี้ย	96/ 14
พันธุ์ขาวดอกมะลิ105		
KDML105 A17D	ต้นเตี้ย	86/ 20
KDML105 A29D	ต้นเตี้ย	83/ 14

1.2 เมล็ดรุ่น C_1 ชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการให้ 5-azacytidine ได้จากทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536) ดังนี้

พันธุ์, สายพันธุ์	**ลักษณะ***	**ความสูง (ซม.)/ จำนวนยอด**
พันธุ์เหลืองประทิว123		
LPT123 C07N	ต้นปกติ	94/ 13
พันธุ์ขาวดอกมะลิ105		
KDML105 C02N	ต้นปกติ	101/ 21

* แบ่งลักษณะไว้โดยทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536)

1.3 เมล็ดรุ่น M_2 สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดเลือกจากรุ่น M_1 ดังนี้

1.3.1 เมล็ดรุ่น M_2 ที่ได้จากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์ LPT123 A10DB รุ่น M_1 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากและต้นสูงแตกกอมาก (แบ่งลักษณะความสูงและการแตกกอตามเกณฑ์ที่ให้ไว้ในวิธีการทดลองข้อ 1.1.2 2))

1.3.2 เมล็ดรุ่น M_2 ที่ได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 สายพันธุ์ KDML105 A17D รุ่น M_1 ที่มีลักษณะต้นเตี้ย (แบ่งลักษณะความสูงและการแตกกอตามเกณฑ์ที่ให้ไว้ในวิธีการทดลองข้อ 1.1.2 2))

1.3.2 เมล็ดรุ่น M_2 ที่ได้จากข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 A94DB รุ่น M_1 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยซึ่งได้จากทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536)

1.4 เมล็ดรุ่น C_2 ชุดควบคุมที่ได้จากรุ่น C_1 ชุดควบคุมดังนี้

1.4.1เมล็ดรุ่น C_2 ที่ได้จากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์ LPT123 C07N รุ่น C_1ที่มีต้นปกติ(แบ่งลักษณะความสูงและการแตกกอตามเกณฑ์ที่ให้ไว้ในวิธีการทดลองข้อ 1.1.2 2))

1.4.2 เมล็ดรุ่น C_2 ที่ได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 สายพันธุ์ KDML105 C02N รุ่น C_1ที่มีต้นปกติ (แบ่งลักษณะความสูงและการแตกกอตามเกณฑ์ที่ให้ไว้ในวิธีการทดลองข้อ 1.1.2 2))

1.4.3 เมล็ดรุ่น C_2 ที่ได้จากข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 C03N รุ่น C_1ที่มีต้นปกติซึ่งได้จากทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536)

1.5 เมล็ดรุ่น M_3 สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดเลือกจากรุ่น M_2 ดังนี้

1.5.1 เมล็ดรุ่น M_3 ที่ได้จากข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 A94DB $M_1$43D รุ่น M_2 ที่มีลักษณะต้นสูงแตกกอมากและต้นเตี้ยแตกกอมาก (แบ่งลักษณะความสูงและการแตกกอตามเกณฑ์ที่ให้ไว้ในวิธีการทดลองข้อ 1.1.2 2))

1.6 เมล็ดรุ่น C_3 ชุดควบคุมที่ได้จากรุ่น C_2 ชุดควบคุมดังนี้

1.6.1 เมล็ดรุ่น C_3 ที่ได้จากข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 C03N $C_1$05N รุ่น C_2 ที่มีต้นปกติ (แบ่งลักษณะความสูงและการแตกกอตามเกณฑ์ที่ให้ไว้ในวิธีการทดลองข้อ 1.1.2 2))

1.7 เมล็ดข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากโครงการ New Varieties of Rice for Saline and Acid Soil Through Tissue Culture รุ่นที่ 6 (R_6) (Vajrabhaya et al., 1987) ดังนี้

พันธุ์กข.23 จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ

RD23 TC26 NaO

RD23 TC110 NaO

พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ

KDML105 TC26 NaO

KDML105 TC161 NaO

พันธุ์เหลืองประทิว123 จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ

LPT123 TC84 NaO

LPT123 TC110 Na0

LPT123 TC167 NaO

LPT123 TC127 Na1

2. วัสดุอุปกรณ์สำหรับปลูกพืชทดลอง

2.1 วัสดุสำหรับปลูกพืชทดลอง

แผ่นโฟมสีขาวกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นิ้ว หนา 1 นิ้ว เจาะรูกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร จำนวน 25 รู

ฟองน้ำตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 X 1 X 5 เซนติเมตร

อ่างพลาสติกกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ก้นอ่าง 9 นิ้ว ที่ปากอ่าง 11 นิ้ว สูง 3.5 นิ้ว

กระถางดินเผา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ปากกระถาง 12 นิ้ว สูง 14 นิ้ว

ทรายล้างสะอาด

แปลงทดลองของสถานีวิจัยข้าวปทุมธานี ขนาด 10 X 10 เมตร

3. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการศึกษา DNA

ถ้วยบดและแท่งบด

spatula

กล่องน้ำแข็ง

ถังสำหรับใส่ไนโตรเจนเหลว

หลอด centrifuge ขนาดปริมาตร 15 มิลลิลิตร

หลอด quick-seal ultracentrifuge ขนาดปริมาตร 38.5 มิลลิลิตร

หลอด microfuge ขนาดปริมาตร 2.2 และ 1.5 มิลลิลิตร

พลาสเจอร์ปิเปตปลายแหลมงอ สำหรับเกี่ยว DNA

กระบอกฉีดยาขนาดปริมาตร 5 มิลลิลิตร

centrifuge, ultracentrifuge, rotor และอุปกรณ์อื่นๆ

high-performance liquid chromatography (HPLC) : A Shimadzu LC-6A HPLC system

spectrophotometric detecter, Recorder

reversed-phase column μBondapak phenyl (300X3.9 mm., Water Division of Millipore)

ตู้บ่มเชื้อ

อุปกรณ์มาตรฐานอื่นๆ สำหรับศึกษาชีววิทยาโมเลกุล

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีสำหรับฆ่าและกำจัดเชื้อ

คลอรอกซ์ (clorox)

tween 20

4.2 สารเคมีสำหรับการเตรียมสารละลายธาตุอาหารใช้ commercial grade (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

4.3 สารเคมีสำหรับคัดเลือกข้าวทนเกลือ NaCl

NaCl ขององค์การเภสัชกรรม

4.4 สารเคมีสำหรับลดระดับการเติมหมู่เมทธิลที่เบส cytosine คือ 5-azacytidine (4-Amino-1-β-D-ribofuranosyl-5-triazin-2[1H]-one) ($C_8H_{12}N_4O_5$) FW 224.2 ของ Sigma รหัส A2385

4.5 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับสกัด DNA การแยก DNA ให้บริสุทธิ์ การย่อย DNA และการวัดปริมาณเบส โดยใช้ HPLC

liquid nitrogen

CsCl

urea extraction buffer (168 g urea, 25 ml 5 M NaCl, 20 ml 1 M Tris-HCL pH 8.0, 16 ml 0.5 M Na_2EDTA pH 8.0, 20 ml 20% Sarkosine, 190 ml H_2O)

phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)

4.4 M ammonium acetate pH 5.2

TE (10 mM Tris-Hcl pH 8.0, 1 mM Na_2EDTA pH 8.0)

90% (V/V) formic acid

triple distilled water

iso-propyl alcohol

ethyl alcohol

iso-amy alcohol

methyl alcohol

RNase

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากและลักษณะต้นเตี้ยในข้าวรุ่น M_1

ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากและลักษณะต้นเตี้ยในข้าวรุ่น M_1 ของข้าว 2 พันธุ์ คือ พันธุ์เหลืองประทิว123 และ พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 โดยได้แบ่งการศึกษาออกเป็นข้อๆ ดังนี้คือ

1.1 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากและลักษณะต้นเตี้ยในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 รุ่น M_1

ศึกษาลูกที่ได้จากการผสมตัวเอง (M_1) ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) จำนวน 3 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ทั้งสามนี้คัดเลือกมาจากการนำเมล็ดข้าวปกติมาชักนำด้วย 5-azacytidine 25 μM ในสภาพ *in vitro* เป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ C_1 ซึ่งไม่ได้ให้ 5-azacytidine 25 μM

รุ่น M_1 LPT123 A10DB
LPT123 A15DB
LPT123 A13D
รุ่น C_1 LPT123 C07N

1.1.1 เพาะเมล็ดและปลูกเลี้ยงข้าว

1) เตรียมเมล็ดข้าวเปลือกรุ่น M_1 และ C_1 มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 40%clorox

2) เพาะเมล็ดในอ่างพลาสติกใส่ทรายจนถึงระยะ 3 ใบ

3) ย้ายต้นอ่อนมาปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตร WP ดัดแปลง บนแผ่นโฟมในอ่างพลาสติก โดยพันหุ้มโคนต้นข้าวด้วยฟองน้ำขนาด 0.5 X 1 X 5 เซนติเมตร ในรูกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร บนโฟมสีขาวกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นิ้ว หนา 1 นิ้ว ลอยในอ่างพลาสติกกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่กันอ่าง 9 นิ้ว ให้สารละลายธาตุอาหารสูตร WP ดัดแปลง เติมน้ำสลับกับสารละลายธาตุอาหารเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารและกำจัดสาหร่ายทุกสัปดาห์ จนต้นข้าวมีใบประมาณ 5-7 ใบ จึงเปลี่ยนไปปลูกในกระถางทรายขนาด 12 นิ้ว สูง 14 นิ้ว ที่ใส่ทรายแม่น้ำล้างสะอาดถึงระดับ 8 นิ้ว

4) การปลูกแบ่งเป็น 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ปลูกโดยใช้จำนวนต้น 1 ต้นต่อกระถาง ในเรือนทดลอง ภายใต้หลังคาพลาสติกใส ตั้งกระถางให้ห่างกัน 50 เซนติเมตร

การทดลองที่ 2 ปลูกในกระถางเช่นเดียวกัน แต่ปลูกกระถางละ 3 ต้น

การทดลองทั้งสองการทดลองให้สารละลายธาตุอาหาร เปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารและกำจัดสาหร่ายทุกสัปดาห์ในเรือนปลูกพืชทดลอง

การทดลองที่ 3 ปลูกในแปลงทดลองของสถานีวิจัยข้าวปทุมธานี โดยมีระยะห่างระหว่างแถวและต้น 40 X 40 เซนติเมตร โดยให้ปุ๋ยไนโตรเจน 2 ครั้ง ให้ครั้งแรกเมื่อต้นข้าวอายุประมาณ 35 วันหลังจากการปลูก และครั้งที่ 2 เมื่อข้าวตั้งท้อง

1.1.2 ศึกษาการแสดงออกและการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากและลักษณะต้นเตี้ย

การศึกษานี้ได้แบ่งเป็นสองส่วนคือ ศึกษาระดับการเติมหมู่เมทธิลที่เบส cytosine และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวดังนี้

1) เมื่อถึงระยะที่รวงแรกปรากฏขึ้น เก็บใบข้าว โดยเก็บเฉพาะแผ่นใบธงและใบที่ถัดจากใบธง ล้างใบด้วยน้ำให้สะอาด ซับให้แห้งใส่ถุงพลาสติก แช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระดับการเติมหมู่เมทธิลที่เบส cytosine

2) เมื่อต้นข้าวเจริญเต็มที่ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังนี้ จำนวนยอดต่อกอ ความสูงของต้น โดยวัดจากโคนต้นถึง collar ของใบธงที่สูงที่สุดเฉลี่ยจาก 3 ยอด ความกว้างและความยาวเฉลี่ยของแผ่นใบธง วันดอกช่อแรกบาน ความยาวรวงวัดจากฐานของรวง (panicle base) ถึงปลายรวงและน้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของลักษณะความสูงเฉลี่ย จำนวนยอดต่อกอเฉลี่ย ความยาวรวงเฉลี่ย และน้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ดเฉลี่ยระหว่างสายพันธุ์ที่ทดลองกับชุดควบคุมโดยวิธี T-TEST GROUP และเก็บเมล็ดสำหรับศึกษารุ่นต่อไป

เกณฑ์ที่ใช้แบ่งลักษณะความสูง

ต้นสูง > $\bar{X}$ + SD หรือ มากกว่าความสูงเฉลี่ยของชุดควบคุมบวกส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของชุดควบคุม

ต้นสูงปกติ = $\bar{X} \pm$ SD หรือ เท่ากับความสูงเฉลี่ยของชุดควบคุมบวกลบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของชุดควบคุม

ต้นเตี้ย < $\bar{X}$ - SD หรือ น้อยกว่าความสูงเฉลี่ยของชุดควบคุมลบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของชุดควบคุม

เกณฑ์ที่ใช้แบ่งลักษณะการแตกกอ

กอมาก > $\overline{X}$ + SD หรือ มากกว่าจำนวนยอดเฉลี่ยของชุดควบคุมบวกส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของชุดควบคุม

กอปกติ = $\overline{X} \pm$ SD หรือ เท่ากับจำนวนยอดเฉลี่ยของชุดควบคุมบวกลบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของชุดควบคุม

กอน้อย < $\overline{X}$ - SD หรือ น้อยว่าจำนวนยอดเฉลี่ยของชุดควบคุมลบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของชุดควบคุม

1.2 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 รุ่น M_1

ทำการทดลองและปลูกเลี้ยงข้าวรุ่น M_1 พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ KDML105 A17D และสายพันธุ์ KDML105 A29D ที่มีลักษณะต้นเตี้ยซึ่งชักนำโดยการให้ 5-azacytidine 25 μM 20 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือข้าวรุ่น C_1 พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 (KDML105 C02N) ที่ไม่ให้ 5-azacytidine โดยดำเนินการทดลองตามการทดลองในข้อ 1.1.1 และ 1.1.2 ทุกประการ

2. ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมาก ลักษณะต้นเตี้ยและลักษณะต้นสูงแตกกอมากในข้าวรุ่น M_2

ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมาก ลักษณะต้นเตี้ยและต้นสูงแตกกอมากในข้าวรุ่น M_2 ของข้าว 3 พันธุ์ คือ พันธุ์เหลืองประทิว123 พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์ กข.23

2.1 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากและต้นสูงแตกกอมากในข้าวรุ่น M_2 ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

2.1.1 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากในข้าวรุ่น M_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์ LPT123 A10DB รุ่น M_1 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากที่คัดเลือกไว้ โดยใช้ลูก C_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์ LPT123 C07N รุ่น C_1ที่มีต้นปกติเป็นชุดควบคุม ดำเนินการทดลองตามข้อ 1.1.1 และข้อ 1.1.2 ทุกประการแต่ปลูกโดยใช้จำนวนต้นข้าว 1 ต้นต่อกระถาง

2.1.2 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นสูงแตกกอมากในข้าวรุ่น M_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์ LPT123 A10DB รุ่น M_1 ที่มีลักษณะต้นสูงแตกกอมากที่คัดเลือกไว้ โดยใช้ลูก C_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 สาย

พันธุ์ LPT123 C07N รุ่น C_1ที่มีต้นปกติเป็นชุดควบคุม ดำเนินการทดลองตามข้อ 1.1.1 และข้อ 1.1.2 ทุกประการแต่ปลูกโดยใช้จำนวนต้นข้าว 1 ต้นต่อกระถาง

2.2 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยในข้าวรุ่น M_2 ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105

ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยในรุ่น M_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 สายพันธุ์ KDML105 A17D รุ่น M_1 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยที่คัดเลือกไว้ โดยใช้ลูก C_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 สายพันธุ์ KDML105 C02N รุ่น C_1 ที่มีต้นปกติเป็นชุดควบคุมดำเนินการทดลองตาม ข้อ 1.1.1 และข้อ 1.1.2 ทุกประการแต่ปลูกโดยใช้จำนวนต้นข้าว 1 ต้นต่อกระถาง

2.3 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยในรุ่น M_2 ของข้าวพันธุ์กข.23

ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยในข้าวรุ่น M_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 A94DB รุ่น M_1ที่มีลักษณะต้นเตี้ยที่คัดเลือกไว้ โดยใช้ลูก C_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 C03N รุ่น C_1 ที่มีต้นปกติเป็นชุดควบคุมดำเนินการทดลองตาม ข้อ 1.1.1 และข้อ 1.1.2 ทุกประการ แต่ปลูกโดยใช้จำนวนต้นข้าว 1 ต้นต่อกระถาง

3. ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นสูงแตกกอมาก และต้นเตี้ยแตกกอมากในรุ่น M_3 ของข้าวพันธุ์กข.23

3.1 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากในข้าวรุ่น M_3 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 A94DB $M_1$43D รุ่น M_2 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมาก โดยใช้ลูก C_3 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 C03N $C_1$05N รุ่น C_2 ที่มีต้นปกติเป็นชุดควบคุม ดำเนินการทดลองตามข้อ 1.1.1 และข้อ 1.1.2 ทุกประการ แต่ปลูกโดยใช้จำนวนต้นข้าว 1 ต้นต่อกระถาง

3.2 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นสูงแตกกอมากในข้าวรุ่น M_3 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 A94DB $M_1$43D รุ่น M_2 ที่มีลักษณะต้นสูงแตกกอมาก โดยใช้ลูก C_3 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 C03N $C_1$05N รุ่น C_2 ที่มีต้นปกติเป็นชุดควบคุม ดำเนินการทดลองตามข้อ 1.1.1 และข้อ 1.1.2 ทุกประการ แต่ปลูกโดยใช้จำนวนต้นข้าว 1 ต้นต่อกระถาง

4. ศึกษาระดับการเติมหมู่เมทธิลที่เบส cytosine

4.1 นำใบข้าวที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากข้อ 1.1.2 ของต้นที่มีลักษณะต้นเตี้ยและต้นเตี้ยแตกกอมากที่ถูกถ่ายทอดมา และข้าวที่มีลักษณะปกติมาสกัดแยก DNA โดยวิธี osmolytic lysis (Cherdshewasart, 1991)

4.1.1 บดตัวอย่างใบข้าวน้ำหนักประมาณ 1 ถึง 2 กรัมในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผงในถ้วยบด

4.1.2 ใส่ตัวอย่างในหลอด centrifuge ขนาดปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่มี urea extraction buffer ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย spatula ใส่สารละลาย Phenol : chloroform : alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

4.1.3 ปั่นแยกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

4.1.4 ดูดย้ายส่วนใสชั้นบน ปริมาตรประมาณ 6 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาดปริมาตร 15 มิลลิลิตร ด้วยปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ตัดปลายใส่ ammonium acetate ความเข้มข้น 4.4 M pH 5.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและใส่ isopropanal ปริมาตร 7 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดจน DNA ตกตะกอนเป็นเส้นบางและรวมกันเป็นกลุ่มก้อน

4.1.5 ใช้พลาสเจอร์ปิเปตปลายงอแหลมเกี่ยวเก็บตะกอน DNA นำไปละลายด้วย TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอด microfuge ขนาดปริมาตร 2.2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าเบาๆ เป็นครั้งคราว

4.1.6 ย่อย RNA ออกจาก DNA ด้วยเอนไซม์ RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร โดยผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเป็นเวลา 30 นาที

4.1.7 ใส่ ammonium acetate ความเข้มข้น 4.4 M pH 5.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ isopropanal ปริมาตร 1.1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดจน DNA ตกตะกอนเป็นเส้นบางและรวมกันเป็นกลุ่มก้อน

4.1.8 ใช้พลาสเจอร์ปิเปตปลายงอแหลมเกี่ยวเก็บตะกอน DNA นำไปล้างด้วย 70% ethanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอด microfuge ขนาดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เทซับและระเหย ethanol ออกจาก DNA ให้หมด และละลาย DNA ด้วย TE buffer (ใช้ 100 ไมโครลิตรต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่าง)

4.2 การแยก DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ CsCl (ดัดแปลงจาก Maniatis et al.,1982)

4.2.1 ละลาย DNA ใน TE buffer ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จน DNA ละลายหมด

4.2.2 ใส่ CsCl น้ำหนัก 12 กรัม ผสมกันเบาๆ จนกระทั่งละลายหมด

4.2.3 ใส่ ethidium bromide ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

4.2.4 ย้ายใส่หลอด quick-seal ultracentrifuge ขนาดปริมาตร 38.5 มิลลิลิตร เติมปริมาตรที่เหลือด้วยน้ำมัน และปิดจุกหลอด บีบล็อคด้วยเครื่องปิดหลอด

4.2.5 ปั่นแยกที่ความเร็ว 60000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4.2.6 เจาะหลอดและดูด DNA ออกจากหลอด quick-seal ultracentrifuge ทางด้านข้างของหลอดด้วยหลอดฉีดยาขนาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเข็มขนาด 15-G ภายใต้แสง UV ซึ่งจะเห็นแถบ DNA ชัดเจน

4.2.7 กำจัด ethidium bromide โดยการสกัดด้วย iso-amyl alcohol ใช้ปริมาตรเท่ากับ DNA ทำซ้ำจนสารละลายไม่มีสี

4.2.8 ตกตะกอนDNA โดยใส่ ammonium acetate ความเข้มข้น 4.4 M pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลาย DNA ใส่ 100% ethanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย DNA และผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดจน ตกตะกอนเป็นเส้นบางและรวมกันเป็นกลุ่มก้อน

4.2.9 เก็บตะกอน DNA ด้วยพลาสเจอร์ปิเปตปลายงอแหลม หรือการปั่นที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอด microfuge ขนาดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เทซับและระเหย ethanol ออกจาก DNA ให้หมดและละลายด้วย TE buffer

4.3 การย่อยเบสออกจาก DNA (Ngernprasertsiri et al., 1988)

การย่อยเบสออกจาก DNA ด้วย 90% (V/V) formic acid (1 μl/g ของ DNA) ที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.4 ศึกษาระดับปริมาณของเบสชนิด 5-azacytidine ต่อ cytosine ทั้งหมด (cytosine และ 5-methylcytosine) และ 5-methylcytosine ต่อเบสทั้งหมดเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างข้าวที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปและข้าวปกติโดยใช้ reversed-phase high-performance liquid chromatography

5. ศึกษาผลของ 5-azacytidine ต่อการแสดงออกลักษณะทนเกลือ NaCl

ศึกษาผลของ 5-azacytidine ต่อการแสดงออกลักษณะทนเกลือ NaCl ของข้าวพันธุ์ กข.23 (RD23) พันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 (KDML105) ชนิดสายพันธุ์ทนเค็มปานกลางจากโครงการ New Varieties of Rice for Saline and Acid Soil Through Tissue Culture รุ่นที่ 6 (R_6) โดยทำการศึกษาในข้าวพันธุ์กข.23 ชนิดสายพันธุ์ทนเค็ม จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ RD23 TC26 NaO และสายพันธุ์ RD23 TC110 NaO พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ชนิดสายพันธุ์ทนเค็มจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ KDML105 TC26 NaO สายพันธุ์ KDML105 TC161 NaO และพันธุ์เหลืองประทิว 123 ชนิดสายพันธุ์ทนเค็มจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ LPT123 TC84 NaO สายพันธุ์ LPT123 TC110 Na0 สายพันธุ์ LPT123 TC167 NaO และสายพันธุ์ LPT123 TC127 Na1 โดยได้ดำเนินการทดลองตามขั้นตอนดังนี้

5.1 คัดเลือกเมล็ดข้าวและฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยคัดเลือกเมล็ดข้าวเปลือกที่สมบูรณ์ ล้างด้วยน้ำผสม tween 20 หลายๆ ครั้ง ฆ่าเชื้อด้วย clorox 40% เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง

5.2 ให้ 5-azacytidine แก่เมล็ดข้าวพันธุ์กข.23 เหลืองประทิว123 และขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์ทนเค็มปานกลาง (ที่ผ่านการแช่น้ำแล้ว 3 วัน) ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน ล้าง 5-azacytidine ออกด้วยน้ำ ตามวิธีการของ Sano และคณะ (1989)

5.3 ย้ายมาปลูกในอ่างพลาสติกใส่ทรายถึงระยะ 3 ใบ และย้ายปลูกต้นอ่อนข้าวในสารละลายธาตุสูตร WP ดัดแปลงบนโฟมในอ่างพลาสติก

5.4 เมื่อถึงระยะ 5 ใบ ทำการคัดเลือกลักษณะทนเกลือ NaCl โดยเลี้ยงต้นอ่อนข้าวระยะ 5 ใบในสารละลายธาตุอาหารสูตร WP ดัดแปลงที่มีเกลือ NaCl 0.5% ควบคุมความเค็มโดยวัดค่าการนำกระแสไฟฟ้าได้ 8-10 มิลลิโมห์ต่อเซนติเมตร เป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารสูตร WP ดัดแปลงที่มีเกลือ 0.5% ทุกสัปดาห์ และเติมน้ำทุก 3 วันในสัปดาห์แรก ทุก 2 วันในสัปดาห์ที่ 2 และทุกๆ วันในสัปดาห์ที่ 3 และ 4

5.5 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การรอดตายกับการทดลองชุดควบคุมระหว่างสายพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์ปกติ ตลอดจนลักษณะต้นของต้นทนเค็ม ย้ายลงปลูกในกระถางดินเผา เมื่อต้นเจริญเต็มที่ ดูลักษณะความสูง การแตกกอ และวันดอกช่อแรกบาน และเก็บเมล็ดเพื่อศึกษาในรุ่นต่อไป