

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างข้าว

เก็บรวบรวมตัวอย่างเมล็ดข้าวไร่พื้นเมืองจากแหล่งปลูกบางพื้นที่ในจังหวัดแม่ฮ่องสอนและในจังหวัดเชียงใหม่จากพื้นที่ต่าง ๆ ดังนี้

- บ้านป่าแป๋ ต.ป่าแป๋ อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน
- บ้านแม่แพม ต.เมืองแหง อ.เวียงแหง จ.เชียงใหม่
- บ้านแม่บวนเหนือ ต.โป่งทุ่ง อ.ดอยเต่า จ.เชียงใหม่
- บ้านปางมะโอ ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่
- บ้านปางมะกล้วย ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่
- บ้านห้วยพานเหนือ ต.บ่อแก้ว อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่
- บ้านหนองศรีชุม ต.บ่อแก้ว อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่
- บ้านแม่ศึก ต.แม่ศึก อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้เก็บและศึกษาด้านสัณฐานวิทยาของเมล็ดข้าว

- 1) Vernier caliper
- 2) กระดาษสีพื้น (ขาว, ดำ)
- 3) กระจกพลาสติก
- 4) ปากกาเมจิกแบบ permanent

3.2.2 อุปกรณ์เครื่องมือ

- 1) หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave)
- 2) เครื่องชั่งสารแบบดิจิตอล (digital balance)
- 3) โกร่งบด (mortar)
- 4) เครื่องเขย่าสาร (vortex)
- 5) ช้อนตักสาร (spatula)
- 6) ฟลาสก์ (flask)
- 7) ปีกเกอร์ (beaker)
- 8) กระบองตวงสาร (cylinder)
- 9) ไมโครปิเปต (micropipette)

- 10) Electrophoresis chamber
- 11) Gel documentation
- 12) เครื่องไมโครเวฟ
- 13) ตู้เย็น
- 14) ตู้แช่แข็ง -20°C
- 15) ตู้แช่แข็ง -80°C

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเมล็ดข้าวไร่พื้นเมือง

ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดข้าว ที่รวบรวมได้จากเกษตรกรในข้อ 3.1 โดยศึกษาลักษณะเชิงคุณภาพคือ สีเมล็ดข้าวเปลือก สีเมล็ดข้าวกล้อง และศึกษาลักษณะเชิงปริมาณคือ ความยาวข้าวเปลือก ความยาวของข้าวกล้อง น้ำหนักข้าวเปลือก และน้ำหนักข้าวกล้อง

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองมาศึกษาลักษณะเชิงคุณภาพโดยศึกษาสีของข้าวเปลือก และสีของข้าวสารโดยวิเคราะห์ผลเป็นร้อยละ ศึกษาลักษณะเชิงปริมาณโดยวัดความยาวของข้าวเปลือก และความยาวของข้าวกล้อง โดยใช้ Vernier caliper วัดตัวอย่างทั้งหมด 20 ซ้ำ และศึกษาน้ำหนักของข้าวเปลือก และน้ำหนักของข้าวกล้องโดยใช้เครื่องชั่งดิจิทัล 3 ตำแหน่ง ชั่งตัวอย่างทั้งหมด 20 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้หาค่าเฉลี่ย และทดสอบความแตกต่างโดยวิธี One way ANOVA และ Duncan's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

นำมาวิเคราะห์ความคล้ายคลึง (Cluster Analysis) ของลักษณะเมล็ดข้าวไร่ โดยใช้ค่าลักษณะเชิงปริมาณและลักษณะเชิงคุณภาพเป็นดัชนี โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (Past3)

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวแต่ละพันธุ์พันธุ์ละ 1 ต้น โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.3.3 การทำสายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ทำสายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการทำพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่จำเพาะเจาะจงกับข้าวโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากฐานข้อมูลข้าวและตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.3.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์มาแยกขนาดโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วทำการบันทึกภาพและบันทึกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากนั้นวิเคราะห์ความเหมือนหรือความต่างกันของดีเอ็นเอของข้าวแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และ

วิเคราะห์ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวแต่ละพันธุ์โดยใช้ค่าทางสถิติและค่าทางพันธุศาสตร์ประชากร

