บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การรวบรวมพันธุ์และการบันทึกลักษณะพริกในกลุ่ม *Capsicum annuum*

รวบรวมพันธุ์พริกที่สำคัญมาจากแหล่งปลูกหลายแห่งเช่น แปลงเกษตรกร ตลาดสด แหล่งรวบรวมพันธุ์พริก และบริษัทเอกชนในต่างประเทศ ได้พริกทั้งหมดจำนวน 15 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1 ถึง 15(ตารางที่ 4.1)ซึ่งเป็นสายพันธุ์พริกที่นิยมใช้กันในประเทศไทย 10 สายพันธุ์ และจากต่างประเทศ 5 สายพันธุ์ จากนั้นนำพริกทั้ง 15 สายพันธุ์มาปลูกสายพันธุ์ละ 10 ต้น ที่สถานีวิจัยของ บริษัทเซมินีส เวเจ็ทเทเบิ้ล สีดส์ (ประเทศไทย) จำกัด จำนวน 1 ครั้ง ในระหว่างเดือน ตุลาคม 2539 ถึงเดือนกุมภาพันธุ์ 2540 โดยปลูกในกระถาง ใช้ระยะระหว่างต้น 60 เซ็นติเมตร และระยะระหว่างแถว 100 เซ็นติเมตร อัตราส่วนของดินผสมที่ใช้ในการปลูกประกอบด้วย ดิน 3 ส่วน ขุยมะพร้าว 2 ส่วน และปุ๋ยคอก 1 ส่วน หลังจากย้ายปลูกได้ 10 วัน ใส่ปุ๋ยผสม 15-15-15 อัตรา 1 ช้อนโต๊ะ ต่อกระถาง และใส่ในอัตราเดิมทุก ๆ 2 สัปดาห์ นอกจากนั้น หลังจากย้ายปลูกได้ 15 วัน ใส่ปุ๋ยเกร็ดสูตร 30-20-10 อัตรา 1 ช้อนโต๊ะ ต่อกระถางทุก ๆ สัปดาห์ จนกระทั่งต้นพริกเริ่มออกดอก และใส่ปุ๋ยอีกครั้งเมื่อต้นพริกเริ่มติดผล โดยใช้ปุ๋ยในอัตราเดิมจนกระทั่งเก็บเกี่ยว ฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืช ทุก 7-10 วันโดยใช้ทั้งสารเคมีป้องกันกำจัดโรค และแมลงผสมกับสารจับใบ ขณะเดียวกันได้ศึกษาลักษณะที่น่าสนใจ หรือลักษณะที่ต้องการ เช่น บันทึกลักษณะทั่วๆ ไป และลักษณะดอก สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้นำแบบบันทึกลักษณะพริกเบื้องต้นของIBPGRมาดัดแปลงใช้ในการบันทึกลักษณะของพริกสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อให้สอดคล้องและเหมาะสมกับระยะเวลาและแรงงานที่มีอยู่ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

ลักษณะของดอกและผล(Flower and fruit character)

1.ช่อดอกและผล (inflorescence and fruit)

1.1 สีผลอ่อน (fruit color in immature stage)

คะแนน		
	1	เขียว (green)
	2	เหลือง (yellow)
	3	ส้ม (orange)
	4	แดง (red)
	5	ม่วง (purple)
	6	น้ำตาล (brown)
	7	ดำ (black)
	8	อื่น ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 สีของผลแก่ (fruit color in nature stage)

คะแนน	1	เขียว (green)
	2	เหลือง (yellow)
	3	ส้ม (orange)
	4	แดง (red)
	5	ม่วง (purple)
	6	น้ำตาล (brown)
	7	ดำ (black)
	8	อื่น ๆ

1.3 ความยาวผล (fruit length)

คะแนน	1	สั้นมาก (น้อยกว่า 1 ซม.)
	3	สั้น (ประมาณ 5 ซม.)
	5	ปานกลาง (ประมาณ 10 ซม.)
	7	ยาว (ประมาณ 15 ซม.)
	9	ยาวมาก (มากกว่า 25 ซม.)

1.4 รูปร่างผล (fruit shape)

คะแนน	1	ผลยาว (elongate)
	2	ผลป้อม (oblate)
	3	ผลกลม (round)
	4	ผลรูปสามเหลี่ยม (conical)
	5	ผลที่หดตัวในส่วนปลายผล (campanulate)
	6	ผลรูประฆัง (bell or blocky)

1.5 การติดผล (fruit set)

คะแนน	3	ต่ำ (low)
	5	ปานกลาง (intermediate)
	7	สูง (high)

1.6 ความกว้างของผล (fruit width) วัดเป็นเซนติเมตรในส่วนของผลที่กว้างที่สุด

1.7 ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (male sterility)

คะแนน	0	ปกติ
	1	เป็นหมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.ลักษณะต้น ความสูงของต้น (plant height) วัดเป็นเซนติเมตรจากระดับผิวดินถึงส่วนยอด

<u>การทดลองที่ 2 การปรับปรุงพันธุ์พริก</u>

การคัดเลือกสายพันธุ์

สังเกตต้นพริกทุก ๆ สัปดาห์บันทึกลักษณะต่าง ๆตามที่ได้กล่าวมาแล้วในการทดลองที่ 1 สรุปผลจากการบันทึกในแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นคัดเลือกไว้เฉพาะสายพันธุ์ที่มีต้นแข็งแรง ไม่เป็นโรค รูปทรงผลดี ติดผลดี และดอกตัวผู้ไม่เป็นหมันสำหรับเป็นสายพันธุ์พ่อ 5 สายพันธุ์ และคัดเลือกไว้เฉพาะสายพันธุ์ที่มีต้นแข็งแรง ไม่เป็นโรค รูปทรงผลดี ติดผลดี และดอกตัวผู้เป็นหมันสำหรับเป็นสายพันธุ์แม่ 2 สายพันธุ์

การผสมพันธุ์

1.การผสมข้ามพันธุ์เริ่มผสมเมื่อต้นพริกอายุ 45 วัน หลังจากย้ายปลูก โดยการปลูกในครั้งนี้จะปลูกสายพันธุ์แม่สายพันธุ์ละ 25 ต้น ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน(รูปที่ 3.1) สลับกับสายพันธุ์พ่อสายพันธุ์ละ 5 ต้น ระยะห่างระหว่างต้นและแถว 60 x 80 เซนติเมตรในมุ้งพลาสติกสีฟ้าขนาด 5 x 10 เมตร เพื่อป้องกันแมลงที่จะมาผสมเกสรดังนี้

1.1 สายพันธุ์แม่เบอร์ 12 25 ต้น x สายพันธุ์พ่อเบอร์ 2, 3, 6, 8 และ 9 สายพันธุ์ละ 5 ต้น

1.2 สายพันธุ์แม่เบอร์ 13 25 ต้น x สายพันธุ์พ่อเบอร์ 2, 3, 6, 8 และ 9 สายพันธุ์ละ 5 ต้น

การผสมเกสรเริ่มจากเวลา 8.30 - 11.00 น. ของทุก ๆ วัน โดยเก็บดอกจากต้นสายพันธุ์พ่อมาเบอร์ละ 10-20 ดอก แบบรวมต้น จะเลือกดอกที่อับละอองเกสรเริ่มแตก นำมาผสมกับต้นสายพันธุ์แม่ซึ่งดอกกำลังเริ่มจะบาน ทำการผสมเกสรดอกพริกจำนวน 20 ดอก/ต้น ใช้เวลาในการผสมประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากผสมประมาณ 45-50 วัน ผลพริกจะเริ่มสุกแดง และเก็บเมล็ดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่3.1 ลักษณะดอกของสายพันธุ์ที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน(ดอกซ้ายมือ) และ เกสรตัวผู้ปกติ (ดอกขวามือ)

รูปที่ 3.2 แปลงทดสอบสายพันธุ์ที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. การผสมตัวเอง ผสมในต้นสายพันธุ์พ่อ โดยตอนเกสรตัวผู้(emasculation) ดอกตูมที่คาดว่าจะบานในวันรุ่งขึ้น และผสมเกสรในช่วงเวลา 8.30 – 11.00น. ของวันถัดมาซึ่งละอองเกสรที่นำมาผสมต้องเป็นต้นเดียวกันกับต้นพริกที่ตอนเกสรตัวผู้ออก หลังจากผสมเกสร 45 - 50 วันสามารถเก็บเกี่ยวผลสุกเพื่อเก็บเมล็ดได้

การทดสอบพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1

นำสายพันธุ์พริกลูกผสมจำนวน 10 สายพันธุ์กับสายพันธุ์พ่อ 5 สายพันธุ์ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกกัน ได้แก่ พริกหนุ่มขาวแม่กุ้ง พริกหนุ่มเขียว พริกบางช้าง พริกหนุ่มเขียวแม่โจ้ และพริกฝาง นำมาปลูกในแปลงทดลองขนาด 1 x 6 เมตร จำนวน 3 ซ้ำ ที่สถานีวิจัยของบริษัทเซมินีส เวทเจทเทเบิ้ล สีดส์ และที่แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่(รูปที่ 3.2) ประเมินผลทดสอบพันธุ์โดยการวัด ความยาวผล ความกว้างผล ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ และเปรียบเทียบความดีเด่นของลูกผสม(heterosis)ในด้านผลผลิตกับสายพันธุ์พ่อ โดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นเนื่องจากเปอร์เซ็นต์ heterosis เท่ากับ

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ยของลูกผสม - ค่าเฉลี่ยของพ่อ-แม่ที่สูงกว่า}}{\text{ค่าเฉลี่ยของพ่อ-แม่ที่สูงกว่า}} \times 100\ \%$$

<u>การทดลองที่ 3 การศึกษาการใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พริก</u>

เป็นการศึกษาข้อมูลเบื้องต้น เพื่อศึกษาการใช้วิธีการทางอิเล็กโทรโฟรีซีสเพื่อประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พริก ทำการวิเคราะห์โดยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยดัดแปลงวิธีการทดลองมาจากวิธีการของ Mc Leod (1983) มีขั้นตอนดังนี้

การสกัดสาร

นำพริกสายพันธุ์ แท้ 7 สายพันธุ์ ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ในการปรับปรุงพันธุ์พริกครั้งนี้ ได้แก่ พริกหนุ่มขาวแม่กุ้ง พริกหนุ่มเขียว พริกหนุ่มเขียวแม่โจ้ พริกบางช้าง และพริกฝาง และลูกผสมที่ได้จากการผสมข้าม 10 สายพันธุ์ มาทำการศึกษาเอนไซม์ 4 ชนิดคือ esterase, glutamate oxaloacetate transamianase, leucine aminopeptidase และ shikimate dehydrogenase นำพริกทั้ง 17 สายพันธุ์มาปลูกในกระบะเพาะกล้าขนาด 60 หลุม เมื่อกล้าอายุได้ 3 สัปดาห์ นำใบอ่อนส่วนยอดประมาณ 3 - 4 ใบมาชั่งเพื่อให้เหมาะสมกับปริมาณสารที่ใช้สกัดเอนไซม์ โดยใช้อัตราส่วนของใบพริกกับสารสกัดเอนไซม์ เป็น 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารสกัดเอนไซม์ประกอบด้วย

0.1 M Tris- HCL pH 7.5	1.2114 กรัม/ 100 มิลลิลิตร
0.001 M EDTA	0.0372 กรัม
0.01 M MgCL2.6H2O	0.2033 กรัม
0.01 M KCL	0.0745 กรัม
2% PVP-40	2.0000 กรัม
0.1% 2-Mercaptoethanol	0.1 มิลลิลิตร

นำใบพริกที่ชั่งแล้วซึ่งเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิต่ำตลอดเวลา มาบดกับสารสกัดเอนไซม์ในโกร่งที่แช่เย็นใส่ไนโตรเจนเหลวประมาณ 15 มิลลิลิตร ขณะบดนำน้ำคั้นที่ได้ใส่หลอดไมโครทิวบ์ (microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แยกเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวใส (supertanent extract) มาทำอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้ตัวกลางที่เป็นโพลีอะคริลาไมด์เจล

การเตรียมเจล

<u>การเตรียมเจลบน(stacking gel)</u>

H_2O	4.8 มิลลิลิตร
0.5 Mtris-HCL pH 6.8	1.2 มิลลิลิตร
30% Acrylic acid	2.0 มิลลิลิตร
10% Ammonium persulphate	80.0 มิลลิลิตร
Temed	8.0 มิลลิลิตร

<u>การเตรียมเจลล่าง(Resolving gel)</u>

H_2O	8.4 มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCL pH 8.8	2.4 มิลลิลิตร
30% Acrylic Acid	5.2 มิลลิลิตร
10% Ammonium persulphate	160.0 มิลลิลิตร
Temed	16.0 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายทั้งเจลบนและเจลล่างแยกกันโดยยังไม่เติม Ammonium persulphate 10% และ Temed คนสารละลายให้เข้ากัน นำไปดูดก๊าซออกประมาณ 15-20 นาที ขณะที่รอประกอบกระจกให้รอยต่อปิดสนิทไม่มีรอยรั่ว นำสารละลายที่ดูดก๊าซออกแล้วมาเติม Ammonium persulphate 10% และ Temed ตามสัดส่วน เทลงในช่องว่างระหว่างกระจกที่เตรียมไว้ ประมาณ 3 ใน 4 ของกระจก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตามด้วยน้ำกลั่นปิดไว้ข้างบนเพื่อกันเจลแห้ง รอให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 30 นาที เทน้ำกลั่นที่ปิดไว้ออกให้หมด จากนั้นเท stacking gel ลงไปพร้อมกับเสียบหวี เพื่อกำหนดช่องว่างสำหรับหยอดตัวอย่าง

การหยอดตัวอย่าง

ใช้ไมโครไซริ้งดูดน้ำกลั่นระหว่างช่องเจลออกให้หมด นำส่วนบนของ chamber มาประกบกับแผ่นเจลที่เตรียมไว้ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (electrode buffer) ให้พอดีกับส่วนที่เป็นแผ่นเจล นำตัวอย่างที่สกัดได้ผสมกับสี oomassie ปั่นให้เข้ากัน จึงนำมาหยอดลงในช่องว่างที่ดึงหวีออกแล้วปิดฝาครอบต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

การเตรียมสารละลายอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์มีดังนี้

Tris pH 8.3	6.0 กรัม (ปรับ pH ให้ได้ 8.3 โดยใช้ NaOH)
Glycine	28.8 กรัม
H_2O	1000.0 มิลลิลิตร

การผ่านกระแสไฟฟ้า

ในช่วงแรกใช้กระแสไฟฟ้าที่ 25 แอมแปร์ เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านส่วนของstacking gel แล้วเปลี่ยนมาใช้กระแสไฟฟ้าที่ 50 แอมแปร์ รอจนระดับเครื่องหมายของสารตัวอย่างอยู่ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ 1 เซนติเมตร จึงหยุดการผ่านกระแสไฟฟ้า

การทำปฏิกิริยาเอนไซม์

แกะแผ่นกระจกที่ประกบกันออก และตัดส่วนล่างของเจลด้านซ้าย หากแผ่นเจลติดกับกระจกแผ่นเล็กเพื่อทำเครื่องหมายลำดับของตัวอย่าง นำเจลลงแช่ในสารละลายสำหรับย้อมเอนไซม์ที่เตรียมไว้ เขย่าให้สารละลายท่วมแผ่นเจลเก็บไว้ในที่มืดประมาณ 6 ชั่วโมงนำมาหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่มีน้ำกลั่นเพื่อรอการประเมินผล การเตรียมสารละลายเอนไซม์มีส่วนประกอบดังนี้

Esterase (EST)

0.1 M phosphate buffer pH 6.0	25 มิลลิลิตร
Alpha-naphthyl acetate	10 มิลลิกรัม
Beta- naphthyl acetate	10 มิลลิกรัม
Fast blue RR salt (or O-Dianisidiue)	25 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Glutamate oxaloacetate transmianase (GOT)

0.1 M Tris- HCL pH 8.5	25 มิลลิลิตร
Alpha-ketoglutaric acid	25 มิลลิกรัม
L- Aspartic acid	50 มิลลิกรัม
Pyridoxal-5'-P	2.5 มิลลิกรัม
Fast blue BB salt	37.5 มิลลิกรัม

Leucine aminopeptidase (LAP)

0.1 M PO4-Buffer pH 6.0	25 มิลลิลิตร
O-Dinisidine	20 มิลลิกรัม
Leucine	10 มิลลิกรัม

Shikimate dehydrogenase (SKD)

0.1 M Tris-HCL pH 8.0	25 มิลลิลิตร
Shikimic acid	15 มิลลิกรัม
NADP	3.75 มิลลิกรัม
NBT	5.0 มิลลิกรัม
PMS	1.0 มิลลิกรัม

การประเมินผล

โดยการวัดระยะทางที่เกิดของแถบสีแต่ละแถบของไอโซไซม์และระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ตามลำดับความเข้มข้นที่ปรากฏ เสร็จแล้วนำมาเขียนรูปแบบของแถบไอโซไซม์ (zymogram)

การทดลองที่ 4 การหาปริมาณสารแคบไซซินในพริก

การหาปริมาณสารแคบไซซินอย่างง่ายดัดแปลงมาจากวิธีการของAnan(1996) ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน การหาปริมาณสารแคบไซซินอย่างง่ายมีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

การสกัดสาร

นำผลพริกที่แก่จัดถึงใกล้สุกทั้ง 17 สายพันธุ์มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีส่วนไส้ติดด้วยจำนวน 3 กรัม นำมาแช่ในสารสกัดแคบไซซิน โดยในการทดลองนี้ใช้ diethyl ether 15 มิลลิลิตรคนในตู้ควันประมาณ 10 –15 วินาที ใช้ปิเปตดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวมา 5 มิลลิลิตรใส่ในบีกเกอร์ขนาด 20 มิลลิลิตร เติม sodium hydroxide 0.5 N และ NaCl 3 มิลลิลิตร (ตามขั้นตอนในที่ รูปที่ 3.3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การประเมินผล

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปวัดค่าค่าการดูดกลืนของแสงที่ 750 นาโนเมตรโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนของแสง เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนของแสงที่วัดได้กับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคบไซซินบริสุทธิ์ โดยนำมาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบความดีเด่นของลูกผสมในด้านความเผ็ด และทดสอบโดยใช้คนทดสอบชิม 10 คน การหาความดีเด่นของลูกผสมในด้านความเผ็ดสามารถหาได้จาก

$$\frac{\text{ค่าความเผ็ดของลูกผสม - ค่าความเผ็ดของสายพันธุ์พ่อแม่ที่ดี}}{\text{ค่าความเผ็ดของสายพันธุ์พ่อแม่ที่ดี}} \times 100\ \%$$

รูปที่ 3. 3 ขั้นตอนการสกัดสารแคบไซซินจากผลพริก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved