

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1

1.1 รวบรวมและศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ

รวบรวมพริกเผ็ดพันธุ์ผสมเปิดจากศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ พจ.07 พจ.06 พจ.27-1-2-1 พจ.25-1-1-1 พจ.2-2-1-1 พจ.4-1-1-1 พจ.5-3-1-1 และ พจ.6-1-1-1 ปลูกเพื่อศึกษาลักษณะ ทางพืชสวน และ วัดความเผ็ดในพริก ทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่แปลงทดลองพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2547 (ภาพ 2) เพาะกล้าลงในถาดหลุม เมื่อต้นกล้าอายุได้ 30 วัน หลังออก ย้ายลงปลูกในแปลงทดลอง วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ในบล็อก (randomized complete block design : RCBD) มี 8 หน่วยการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ ขนาดแปลงทดลอง 0.50 x 2.5 เมตร ระยะห่างระหว่างต้น 50 เซนติเมตร ปลูกแถวเดียว แปลงละ 5 ต้น ดังภาพที่ 1 ใช้น้ำปุ๋ย 15-15-15 คลุกฟูราดาน รองกันหลุม โดยใส่ หลุมละ ประมาณ 15 กรัม/หลุม หรือ ประมาณ 50 กิโลกรัม/ไร่ ใส่น้ำปุ๋ยสูตร 21-0-0 โดยผสมน้ำรด และ ฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลง ทุกๆ 7 วัน เมื่อต้นกล้าอายุได้ ประมาณ 40 วัน หลังย้ายลงแปลง ปลูก และเริ่มออกดอกเปลี่ยนมาใส่น้ำปุ๋ย สูตร 16 – 20 – 0 อัตรา 10 กรัม/ต้น หรือ 33 กิโลกรัม/ไร่ โดยให้น้ำปุ๋ยบริเวณโคนต้น ทุก 7 วัน บันทึกลักษณะทางพืชสวน ได้แก่ สีผลอ่อน สีผลแก่ การวางตัวของผล ความยาวผล ลักษณะผล การติดผล ความสูงของทรงพุ่ม ความกว้างของทรงพุ่ม ลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้น การเป็นหมันของเกสรเพศผู้ โดยเริ่มบันทึก เมื่อต้นพริก อายุ ประมาณ 90 วัน ตามแบบแผนของ IBPGR (1982) และเก็บผลผลิตมาชั่งน้ำหนัก เพื่อหาผลผลิตแต่ละพันธุ์ ขณะเดียวกันทำการผสมตัวเอง และ คัดเลือกพันธุ์ที่มี สีผิวสีเขียวเข้ม มีความเผ็ดสูง ผลค่อนข้างตรงและยาว เพื่อนำมาใช้เป็นสายพันธุ์พ่อต่อไป

สายพันธุ์แม่ เป็นพันธุ์ ที่มีลักษณะเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนและไซโทพลาสซึม (cytoplasmic genic male sterility) (Smsms) จำนวน 3 สายพันธุ์ นำมาจากการทดลองของกนกวรรณ (2546) ซึ่งได้รับการพัฒนาสายพันธุ์ ในงานวิทยานิพนธ์ของกฤษฎา (2544) ได้แก่ พันธุ์ 2735BC₂#14 -2 2740BC₂#10 -3 และ 2735BC₂#16-1 เริ่มปลูก เดือน พฤศจิกายน 2547



ภาพ 3 แปลงปลูกและคัดเลือกพันธุ์พ่

แบบบันทึกลักษณะทางพืชสวนของพริก (IBPGR, 1982)

1. ช่อดอกและผล (inflorescence and fruit)

1.1 สีของผลอ่อน (fruit color in imature stage)

คะแนน

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

1.2 สีของผลแก่ (fruit color in mature stage)

คะแนน

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

1.3 ลักษณะการวางตัวของผล (fruit position)

คะแนน

- | | |
|---|-------------------------------|
| 3 | ห้อยลง (declining) |
| 5 | ระดับปานกลาง (intermediate) |
| 7 | ผลตั้ง (erect) |

1.4 ความยาวผล (fruit length)

คะแนน

- | | |
|---|----------------------------------|
| 1 | สั้นมาก (น้อยกว่า 1 เซนติเมตร) |
| 3 | สั้น (น้อยกว่า 5 เซนติเมตร) |
| 5 | ปานกลาง (ประมาณ 10 เซนติเมตร) |
| 7 | ยาว (ประมาณ 15 เซนติเมตร) |
| 9 | ยาวมาก (มากกว่า 25 เซนติเมตร) |

1.5 ลักษณะผล (fruit shape)

คะแนน

- | | |
|---|--|
| 1 | ผลยาว (elongate) |
| 2 | ผลป้อม (oblate) |
| 3 | ผลกลม (round) |
| 4 | ผลรูปกรวยปลายแหลม (conical) |
| 5 | ผลที่หกดัวในส่วนปลายผล (campanulate) |
| 6 | ผลรูประฆัง (bell or blocky) |

1.6 ความมีรสของผล

คะแนน

- | | |
|---|--------------------------------|
| 0 | รสจืด (not pungent or sweet) |
| 3 | มีรสเล็กน้อย (low) |
| 5 | มีรสปานกลาง (intermediate) |
| 7 | มีรสจัดมาก (high) |

1.7 การติดผล (fruit set)

คะแนน

- | | |
|---|--------------------------|
| 3 | ต่ำ (low) |
| 5 | ปานกลาง (intermediate) |
| 7 | สูง (high) |

1.8 ความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ (male sterility)

คะแนน

- | | |
|---|------------------|
| 0 | ไม่มี (absent) |
| 1 | มี (present) |

1.9 ความกว้างของผล (fruit set) วัดเป็นเซนติเมตรในส่วนของผลที่กว้างที่สุด

2. ลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้น (plant growth habit)

2.1 ลักษณะทรงพุ่ม (plant growth habit)

คะแนน

3 ต้นเตี้ยแผ่กิ่งก้านสาขา

5 ทรงพุ่ม (compact)

7 ทรงต้นสูง (erect)

2.2 ความสูงของต้น (plant height) วัดเป็นเซนติเมตรจากระดับผิวดินถึงส่วนสูง

2.4 ความกว้างของทรงพุ่ม (plant width) วัดเป็นเซนติเมตรในส่วนที่กว้างที่สุด

1.2 การผสมตัวเองในพริกที่ปลูกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์พ่อ

ทำการผสมตัวเองเพื่อ ลดความแปรปรวนในสายพันธุ์พ่อ โดยผสมพันธุ์พริก ทั้ง 8 สายพันธุ์ ได้แก่ พจ. 2-2-1-1 พจ. 4-1-1-1 พจ. 5-3-1-1 พจ. 6-1-1-1 พจ. 06 พจ. 07 พจ. 25-1-1-1 และ พจ. 27-1-2-1 เมื่อพริกมีอายุได้ 30 วัน หลังย้ายลงแปลงปลูก ทำการผสมโดย นำถุงกระดาษมาคลุมดอกพริกที่พร้อมจะบานในวันรุ่งขึ้น เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการผสมข้ามดอก และป้องกันแมลงเช่น ผึ้ง บินมาเกาะดอก การผสมพันธุ์นี้จะผสมโดยใช้เกสรเพศผู้ในดอก และต้นเดียวกันผสม เวลาที่เหมาะสมสำหรับการผสมพันธุ์ คือ 8.00 – 10.00 นาฬิกา และ 16.00 – 17.30 นาฬิกา เมื่อผสมเสร็จแล้ว ก็ คลุมดอกไว้ดั้งเดิม และเขียน ป้ายบอกชื่อพันธุ์ และวัน เดือน ปี ที่ผสม

1.3 ผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1

ปลูกสายพันธุ์แม่จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ 2735BC₂#16-1 2735BC₂#14-2 และ 2740BC₂#10-3 ซึ่งแต่ละพันธุ์มีทั้ง ต้นที่มีเกสรเพศผู้ปกติ (male fertile) และต้นที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน (male sterile) ลักษณะเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนและไซโทพลาซึม (cytoplasmic genic male sterility) (ภาพ 4) คัดเลือกเฉพาะต้นที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน (male sterile) ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง โดยนำละอองเกสรจากสายพันธุ์พ่อที่ได้มาจากการทดลองที่ 1.1 ซึ่ง

คัดเลือกจากพันธุ์ที่ผลมีลักษณะ ผิวสีเขียวเข้ม ก่อนข้างตรงและยาว และมีความเผ็ด จำนวน 2 พันธุ์ คือพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 และ พันธุ์ พจ. 25-1-1-1 โดยใช้พันธุ์แม่ 1 พันธุ์ ผสมกับสายพันธุ์พ่อ 2 พันธุ์ (ตาราง 6)

ตาราง 6 การผสมข้ามระหว่างพ่อ 2 สายพันธุ์ กับ แม่ 3 สายพันธุ์

♀ \ ♂	2735BC ₂ #16-1	2735BC ₂ #14-2	2740 BC ₂ #10-3
พจ. 5-3-1-1	×	×	×
พจ. 25-1-1-1	×	×	×

นำถุงกระดาษคลุมดอกพริกสายพันธุ์พ่อ และคลุมดอกสายพันธุ์แม่ไว้ในตอนเย็น เลือกดอกที่พร้อมจะบานในวันรุ่งขึ้น และผสมเกสรในวันต่อมา (ภาพ 5) เวลาที่ผสมคือ 8.00- 10.00 และ 16.00-17.30 นาฬิกา เมื่อผสมเสร็จ ก็คลุมดอกไว้ดังเดิม และเขียน ป้ายบอกชื่อพันธุ์แม่และพ่อ ที่นำมาผสมกัน วัน เดือน ปี ที่ผสม (ภาพ 6) เมื่อติดผล แล้ว แกะ ถุงที่คลุมดอก ออกเพื่อให้ผลเจริญเติบโตได้เต็มที่ หลังจากที่ได้ติดผลประมาณ 90 วัน ผลแก่มีสีแดง เก็บผลมาแกะเมล็ด แล้วฝังแคดร่าไร ประมาณ 1 อาทิตย์ จึงเก็บเมล็ดมาคลุกยากันเชื้อรา แล้วใส่ถุงปิดสนิท



ภาพ 4 ลักษณะของดอกพริกเผ็ดที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมั่น (ขวามือ)
และเกสรเพศผู้ปกติ (ซ้ายมือ)



ภาพ 5 การผสมเกสรของพริกเผ็ด



ภาพ 6 การผสมตัวเอง ของสายพันธุ์พ่อ

1.4 ทดสอบการงอกของละอองเกสรเพศผู้ในสายพันธุ์แม่

เก็บดอกพริกต้นที่มีละอองเกสรปกติ และต้นที่มีละอองเกสรเป็นหมันจากสายพันธุ์แม่ ได้แก่ 2735BC₂#14-2 2735BC₂#16-1 และ 2740BC₂#10-3 โดยเด็ดดอกพร้อมจะบานในวันถัดไป เก็บไว้ในกล่องที่มีความชื้น เมื่อดอกบานนำดอกมาเคาะละอองเกสรบนสไลด์ ที่มีอาหารสังเคราะห์ (อคิสร, 2546) นำสไลด์ ไปวางไว้บนหลอดแก้วใน petridish ที่มีกระดาษทิชชูเปียกชื้นรองอยู่ ปิดฝา petridish เพื่อไม่ให้อาหารแห้ง เก็บ petridish ไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้อง Hirox stereomicroscope เป็นระยะๆ ซึ่งหลอดเกสรจะเริ่มงอกได้ตั้งแต่ภายใน 5 – 45 นาที

การทดลองที่ 2 ทดสอบพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1

ปลูกทดสอบพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสม ในการทดลอง ที่ 1.3 จำนวน 6 สายพันธุ์ ดังนี้ 2735BC₂#14-2-1 x พจ. 25-1-1-1 2735BC₂#14-2-1 x พจ. 5-3-1-1 2735BC₂#16-1-4 x พจ. 25-1-1-1 2735BC₂#16-1-4 x พจ. 5-3-1-1 2740BC₂#10-3 -3 x พจ. 25-1-1-1 2740BC₂#10-3-3 x พจ. 5-3-1-1 โดยนำมาปลูกเปรียบเทียบพันธุ์กับพริกลูกผสมพันธุ์การค้า ที่เกษตรกรนิยมปลูก จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ แม่ปิ้ง 80 และจักรพรรดิ โดยปลูกทดสอบที่แปลงทดลองพืชสวนคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในฤดูฝน พ.ศ. 2548 ประเมินผลผลิตโดยวัดความกว้างผล ความยาวผล น้ำหนักผลผลิตต่อต้น ผลผลิตต่อพื้นที่ และเปรียบเทียบความดีเด่นของลูกผสม (heterosis) ในด้านผลผลิตกับสายพันธุ์ พ่อ คือพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 และ พจ. 25-1-1-1

เปอร์เซ็นต์ heterosis (ความดีเด่นของลูกผสม) คำนวณ ได้ดังนี้

$$\% \text{ heterosis} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของลูกผสมต่อต้น} - \text{ค่าเฉลี่ยของพ่อต่อต้น}}{\text{ค่าเฉลี่ยของพ่อต่อต้น}} \times 100 \%$$

ค่าเฉลี่ยของพ่อต่อต้น

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในบล็อก (randomized complete block design) มีจำนวน 10 หน่วยการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ ระยะปลูกระหว่างแถว 50 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างต้น 50 เซนติเมตร ปลูกแถวคู่ แถวละ 5 ต้น (ภาพ 6) ใส่ปุ๋ยคอก ปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 และปุ๋ยราดาน คลุกเคล้าให้เข้ากัน และใส่รองก้นหลุม อัตรา 15 กรัม/หลุม หรือ 50 กิโลกรัม/ไร่ รดน้ำเช้า เย็นใน 7 วันแรก หลังจากนั้น ให้น้ำวันละครั้ง ใส่ปุ๋ยสูตร 21-0-0 โดยผสมน้ำรด และฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง และสารเคมีควบคุมเชื้อรา ทุก ๆ 7 วัน เมื่อต้นกล้าอายุได้ ประมาณ 40 วัน หลังย้ายลงแปลง ปลูก และเริ่มออกดอกเปลี่ยนมาใส่ปุ๋ย สูตร 16 – 20 – 0 อัตรา 10 กรัม/ต้น หรือ 33 กิโลกรัม/ไร่ โดยให้ปุ๋ยบริเวณโคนต้น ทุก 7 วัน



ภาพ 7 แปลงปลูกทดสอบสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและพันธุ์การค้า

การทดลองที่ 3 การหาปริมาณสารแคปไซซิน ในผลพริก

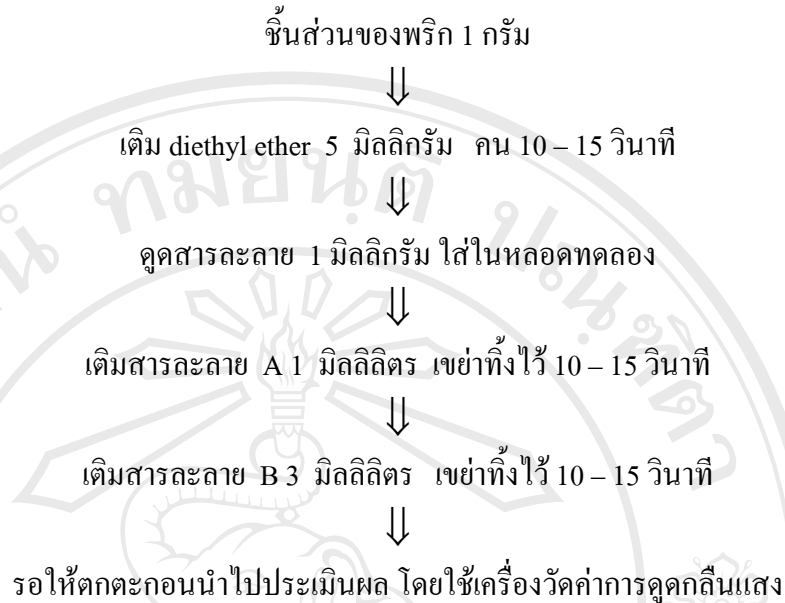
วัดปริมาณสารแคปไซซินของพันธุ์พริกที่ทดลอง โดยวิธี ของ Anan *et al.* (1996) ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน และนำพริกทั้งหมด มาให้คนชิม จำนวน 10 คน

5.1 ทดสอบ หาปริมาณ สารแคปไซซิน ในพริกสายพันธุ์พ่อ ได้แก่ พจ. 07 พจ. 06 พจ. 27-1-2-1 พจ. 25-1-1-1 พจ. 2-2-1-1 พจ. 4-1-1-1 พจ. 5-3-1-1 และ พจ. 6-1-1-1 นำพริก ทั้ง 8 พันธุ์ มาคัดเลือกพันธุ์ ที่มีความเผ็ด สูงสุด ลำดับที่ 1 และ 2 เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์พ่อในการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง

5.2 ทดสอบ หาปริมาณ สารแคปไซซิน ในพริกสายพันธุ์ลูกผสม สายพันธุ์พ่อและพันธุ์การค้า นำมาเปรียบเทียบปริมาณสารแคปไซซิน ระหว่างลูกผสมทั้ง 6 พันธุ์ กับพริกสายพันธุ์พ่อ ได้แก่ พจ. 25 -1-1-1 และ พจ. 5-3-1-1 พันธุ์การค้า ได้แก่ พันธุ์แม่ปิง 80 และ จักรพรรดิ

วิธีการสกัดสาร

นำผลพริกแก่จัดถึงใกล้สุก 10 สายพันธุ์ มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีได้ติดอยู่ด้วย จำนวน 3 กรัม แช่ใน diethyl ether 15 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 10 – 15 วินาที ใช้ปิเปตดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย sodium hydroxide 0.5 N 3 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ 10– 15 วินาที และเติม ferric chloride 1 เปอร์เซ็นต์ กับสารละลาย potassium ferricyanide 1 เปอร์เซ็นต์ กับกรด hydrochloric เข้มข้น ที่เป็นอินดิเคเตอร์ 3 มิลลิลิตร ตามขั้นตอน (ภาพ 8)



ภาพ 8 ขั้นตอนการสกัดสารแคปไซซินจากผลพริก

หมายเหตุ

1. สารละลาย A ประกอบด้วย sodium hydroxide 2 กรัม และ sodium chloride 2 กรัม ละลายให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. สารละลาย B ประกอบด้วย ferric chloride 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร potassium ferricyanide 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร และไตเตรทด้วยกรด hydrochloric เข้มข้น 5 มิลลิลิตร สาร B ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งเพราะเป็นสารที่มีสภาพไม่คงที่

การประเมินผล

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบความเข้มข้นของลูกผสมในด้านความเผ็ด และทดสอบโดยใช้คนชิมจำนวน 10 คนการหาค่าความเข้มข้นของลูกผสมในด้านความเผ็ดหาได้จาก

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