

บทที่ ๓

ผลการทดลอง

ตอนที่ ๑ การประเมินพันธุกรรมพริกเทศผู้เป็นในไฮโดรพลาสซึม

๑.๑ การประเมินพันธุกรรมพริกเทศผู้เป็นในไฮโดรพลาสซึมด้วยวิธี fertility scoring โดยใช้พันธุ์ PEPAC 32

๑.๑.๑ ผลการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรของลูกผสม ระหว่างสายพันธุ์ เพศผู้เป็นหมัน (A line) PEPAC 32 กับพันธุ์พริกใหญ่ จำนวน ๑๔ คู่ผสม พบว่ามีพันธุ์ที่มีละอองเกสรที่มีชีวิตทั้งหมด ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในพันธุ์เดียวกัน และพันธุ์ที่ละอองเกสรที่ไม่มีชีวิต ทั้งหมด จึงสามารถใช้ผลนี้ประเมินพันธุกรรมของพริกลูกผสม และพ่อพันธุ์ซึ่งเป็นพริกใหญ่ (ตารางที่ ๑๓) จำนวน ๑๔ พันธุ์ ผลการประเมินพบว่าพริกใหญ่ที่ทดสอบมีพันธุ์รักษาเพศผู้ เป็นหมัน (Nmsms) ๔ พันธุ์ เพศผู้ปกติ (N/S MsMs) ๓ พันธุ์ และพันธุ์ที่มียีน Ms และ ms (N/S Msms) ๑๑ พันธุ์

ตารางที่ ๑๓ พันธุกรรมของพ่อพันธุ์ พริก ประเมินจากความมีชีวิตของละอองเกสรเพศผู้ (fertility scoring) ของพริกพันธุ์ลูกผสม ฤดูหนาว พ.ศ.๒๕๕๓ โดยใช้พันธุ์เพศผู้เป็นหมันพันธุ์ PEPAC 32

ลำดับ	พันธุ์	จำนวนต้นที่เป็นหมันหรือปกติ			พันธุกรรมของพ่อพันธุ์
		ไม่เป็นหมัน	เป็นหมัน	รวม	
๑	PP32 -42 × CA1445-1	๓	๓+๒๓1	๒๓๔	N/S Msms
๒	PP32 -7 × CA1445-7-8	๓		๓	N/S MsMs
๓	PP32 -10 × CA1447-4-12-9	๓		๓	N/S MsMs
๔	PP32 -18 × CA1447-8-12-9	๔		๔	N/S MsMs
๕	PP32 -25 × CA1448-5-13-9	๑	๓+๒1	๖	N/S Msms
๖	PP32 -7-3 × CA1449-2-4-1	๘	๒+๖1	๑๖	N/S Msms
๗	PP32 -7-3 × CA1449-2-4-7	๑๖	๒+๑๒1	๓๐	N/S Msms
๘	PP32 -35 × CA1449-2-5-10	๒	๑+๔1	๗	N/S Msms
๙	PP32 -126 × CA1449-3-8-3		๑๐+๑๖1	๒๖	N msms

I - เกสรเพศผู้เป็นหมันและปกติในต้นเดียวกัน

ตารางที่ ๑๓ พันธุกรรมของพ่อพันธุ์ พริก ประเมินจากควมมีชีวิตของละอองเกสรเพศผู้ (fertility scoring) ของพริกพันธุ์ลูกผสม ถูยหนาว พ.ศ.๒๕๕๓ โดยใช้พันธุ์เพศผู้เป็นหมันพันธุ์ PEPAC 32 (ต่อ)

ลำดับ	พันธุ์	จำนวนต้นที่เป็นหมันหรือปกติ			พันธุกรรมของพ่อพันธุ์
		ไม่เป็นหมัน	เป็นหมัน	รวม	
๑๐	PP32 -37 × CA1449-3-9-8		๔+๑๓1	๑๓1	N msms
๑๑	PP32 -7-6 × CA1450-2-14-1	๑	๒1	๓	N/S Msms
๑๒	PP32 -6 × CA1450-3-6-9	๑	๑+๓1	๓1	N/S Msms
๑๓	PP32 -7-9 × CA1450-5-17-2	๓	๑1	๔	N/S Msms
๑๔	PP32 -7-8 × CA1450-6-9-1	๖	๑๐1	๑๖	N/S Msms
๑๕	PP32 -7 × CA1450-7-10-1	๑	๓+๓1	๓1	N/S Msms
๑๖	PP32 × CA1450-7-10-10	๑	๖+๑๐1	๑๓1	N msms

1-เกสรเพศผู้เป็นหมันและปกติในต้นเดียวกัน

๑.๒ การประเมินพันธุกรรมพริกเพศผู้เป็นในไฮโดพลาสซึมด้วยวิธี fertility scoringโดยใช้พันธุ์ PEPAC 38

พบว่าพันธุ์ที่มีละอองเกสรที่มีชีวิตทั้งหมด ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในพันธุ์เดียวกัน และพันธุ์ที่ละอองเกสรที่ไม่มีชีวิตทั้งหมด จึงสามารถใช้ผลนี้ประเมินพันธุกรรมของพริกลูกผสม และพ่อพันธุ์ซึ่งเป็นพริกใหญ่ (ตารางที่ ๑๔) จำนวน ๓ พันธุ์ ผลการประเมินพบว่าพริกใหญ่ที่ทดสอบมีพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมัน (N msms) ๑ พันธุ์ เพศผู้ปกติ (N/S MsMs) ไม่มี และพันธุ์ที่มียีน Ms และ ms (N/S Msms) ๒ พันธุ์ และไม่ได้ทำการประเมินพันธุ์ลูกผสมอีกเนื่องจากพันธุ์เพศผู้เป็นหมัน (A line) PEPAC 38 ติดผลเองมีเมล็ดจำนวนมาก จึงทำให้การประเมินไม่หน้าเชื่อถือ

ตารางที่ ๑๔ พันธุกรรมของพ่อพันธุ์ พริก ประเมินจากควมมีชีวิตของละอองเกสรเพศผู้ (fertility scoring) ของพริกพันธุ์ลูกผสม ถูหนาว พ.ศ.๒๕๕๓ โดยใช้พันธุ์เพศผู้เป็นหมันพันธุ์ PEPAC 38

ลำดับ	พันธุ์	จำนวนต้นที่เป็นหมันหรือปกติ			พันธุกรรม ของพ่อพันธุ์
		ไม่เป็นหมัน	เป็นหมัน	รวม	
๑	PP38 -11 × CA1445-1		๑+๒1	๓	N msms
๒	PP38 -30 × CA1450-7-10	๓F/S	๔+๓1	๓7	N/S Msms
๓	PP38 -87 × CA1450-7-11	๓	๑+๕1	๑๐	N/S Msms

I-เกสรเพศผู้เป็นหมันและปกติในต้นเดียวกัน

๑.๑.๓ ผลการทดสอบควมมีชีวิตของละอองเกสรของลูกผสม ระหว่างสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมัน (A line) PEPAC 32 กับพันธุ์พริกใหญ่ จำนวน ๔ คู่ผสม พบว่ามีพันธุ์ที่มีละอองเกสรที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในพันธุ์เดียวกัน และพันธุ์ที่ละอองเกสรที่ไม่มีชีวิตทั้งหมด จึงสามารถใช้ผลนี้ประเมินพันธุกรรมของพริกลูกผสม และพ่อพันธุ์ซึ่งเป็นพริกใหญ่ (ตารางที่ ๑๕) จำนวน ๔ พันธุ์ พบว่าพริกใหญ่ที่ทดสอบมีพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมัน (Nmsms) ๓ พันธุ์ เพศผู้ปกติ (N/S MsMs) ไม่มีเลย และพันธุ์ที่มียีน Ms และ ms (N/S Msms) ๕ พันธุ์

พ่อพันธุ์CA1445-2-6-18-1 ได้แสดงผลการประเมินในตารางที่ ๑๕ เป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมัน ซึ่งเดิมพันธุ์นี้ได้ผลการประเมินเช่นเดียวกันในตารางที่ ๕ แสดงว่าพันธุ์ดังกล่าวมีความเสถียรของยีนรักษาเพศผู้เป็นหมัน จากผลการประเมินในตารางที่ ๑๓ จะเห็นว่าพันธุกรรมของพ่อพันธุ์CA1445-1 และ CA1445-7-8 ไม่ได้เป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมัน แต่สามารถใช้พันธุ์CA1445-2-6-18-1 คัดยีนเพศผู้เป็นหมันได้

พ่อพันธุ์ CA1445-2-4-19-5 แสดงผลการประเมินในตารางที่ ๑๕ เป็นพันธุ์เฮเทอไรซัส ซึ่งเดิมพันธุ์นี้ได้ผลการประเมินเช่นเดียวกันดังแสดงในตารางที่ ๕ พันธุ์นี้ไม่ได้เป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมัน แต่สามารถใช้คัดยีนเพศผู้เป็นหมันได้

พ่อพันธุ์CA1445-7-8-32-2 แสดงผลการประเมินในตารางที่ ๑๕ เป็นพันธุ์เฮเทอไรซัส ซึ่งเดิมพันธุ์นี้ได้ผลการประเมินเป็นพันธุ์เพศผู้ปกติในตารางที่ ๕ และ ตารางที่ ๑๓แสดงว่าพันธุ์กล่าวมีการกระจายของพันธุกรรมไม่ควรใช้ในการคัดยีนเพศผู้เป็นหมัน

พ่อพันธุ์ CA1447-3-2-1-5 แสดงผลการประเมินในตารางที่ ๑๕ เป็นพันธุ์เฮเทอไรซัส ซึ่งเดิมพันธุ์นี้ได้ผลการประเมินเช่นเดียวกันในตารางที่ ๕ พันธุ์นี้ไม่ได้เป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมัน แต่สามารถใช้คัดยีนเพศผู้เป็นหมันได้

พ่อพันธุ์ CA1448-2-5 แสดงผลการประเมินในตารางที่ ๑๕ เป็นพันธุ์เฮทเทอโรไซกัส ซึ่งเดิมพันธุ์นี้ได้ผลการประเมินเป็นพันธุ์เพศผู้ปกติในตารางที่ ๕ พันธุ์นี้ไม่ได้เป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมัน แต่สามารถใช้คัดยีนเพศผู้เป็นหมันได้

พ่อพันธุ์ CA1448-5-13-8-3 ได้แสดงผลการประเมินในตารางที่ ๑๕ เป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมัน ซึ่งเดิมพันธุ์นี้ได้ผลการประเมินเป็นพันธุ์เฮทเทอโรไซกัส ดังแสดงในตารางที่ ๕ และพันธุ์ CA1448-5-13-9 เป็นพันธุ์เฮทเทอโรไซกัส ในตารางที่ ๑๓ แสดงว่าพันธุ์ดังกล่าวไม่ได้เป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมันเพราะจำนวนต้นที่ประเมินในตารางที่ ๑๕ มีจำนวนน้อยจึงไม่พบต้นที่แสดงเพศผู้ปกติ แต่สามารถคัดยีนเพศผู้เป็นหมันได้

พ่อพันธุ์ CA1449-3-13-8 แสดงผลการประเมินในตารางที่ ๑๕ เป็นพันธุ์เฮทเทอโรไซกัส ซึ่งเดิมพันธุ์นี้ได้ผลการประเมินเป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมันในตารางที่ ๕ พันธุ์ CA1449-3-9-8เป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมันในตารางที่ ๑๓ แสดงว่าพันธุ์ CA1449-3-13-8 สามารถใช้คัดยีนเพศผู้เป็นหมันได้

พ่อพันธุ์CA1450-2-14-1-4 ได้แสดงผลการประเมินในตารางที่ ๑๕ เป็นพันธุ์รักษาเพศผู้เป็นหมัน ซึ่งเดิมพันธุ์นี้ได้ผลการประเมินเป็นพันธุ์เพศผู้ปกติในตารางที่ ๕ และเป็นพันธุ์เฮทเทอโรไซกัส จากผลการประเมินในตารางที่ ๑๔ แสดงว่ายีนรักษาเพศผู้เป็นยังมีการกระจายตัว แต่สามารถใช้คัดยีนเพศผู้เป็นหมันได้

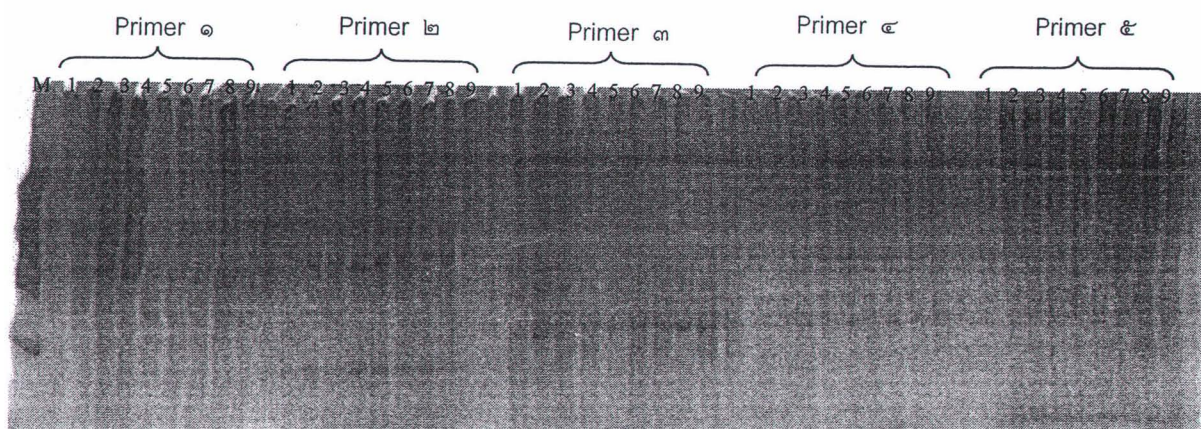
ตารางที่ ๑๕ พันธุกรรมของพ่อพันธุ์ พริก ประเมินจากควมมีชีวิตของละอองเกสรเพศผู้ (fertility scoring) ของพริกพันธุ์ลูกผสม ถดุดน พ.ศ.๒๕๕๔ โดยใช้พันธุ์เพศผู้เป็นหมันพันธุ์ PEPAC 32

ลำดับ	พันธุ์	จำนวนต้นที่เป็นหมันหรือปกติ			พันธุกรรมของพ่อพันธุ์
		ไม่เป็นหมัน	เป็นหมัน	รวม	
๑	PP32-76 x CA1445-2-6-18-1	๐	๒๑S+๑I	๒๒	Nmsms
๒	PP32-5 x CA1445-2-4-10-5	๑๘	๓S+๕I	๒๖	N/SMsms
๓	PP32-1 x CA1445-7-8-32-2	๒	๑S+๔I	๓	N/SMsms
๔	PP32-5-26 x CA1447-3-2-1-5	๑๖	๒S+๕I	๒๓	N/SMsms
๕	PP(32 x 33)-9 x CA1448-2-5	๑๙	๑S+๖I	๒๖	N/SMsms
๖	PP32-3 x CA1448-5-13-8-3	๑	๑๐S+๑I	๑๒	Nmsms
๓/	PP32-1 x CA1449-3-9-13-8	๑	๕S+๘I	๑๔	N/SMsms
๘	PP(32 x 31) x CA1450-2-14-1-4	๐	๒๒S+๘I	๓๐	Nmsms

๑.๒ การประเมินพันธุกรรมพริกด้วยวิธี การใช้เครื่องหมายโมเลกุล (DNA marker)

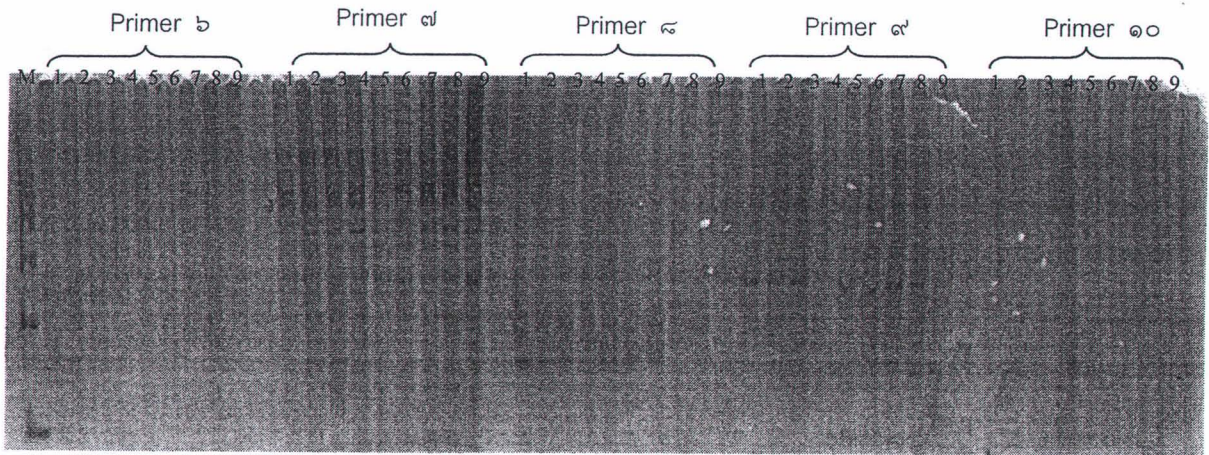
๑.๒.๑ การคัดกรองไพรเมอร์เพิ่มเติม

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ ๒๑ ชนิด พบว่าไพรเมอร์ ๘ ชนิดคือ หมายเลข ๑-๓, ๓'-๕', ๑๓ และ ๑๕ (รูปที่ ๔-๓) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพริก ทั้งสามพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์กรรมที่ต้องการทดสอบ



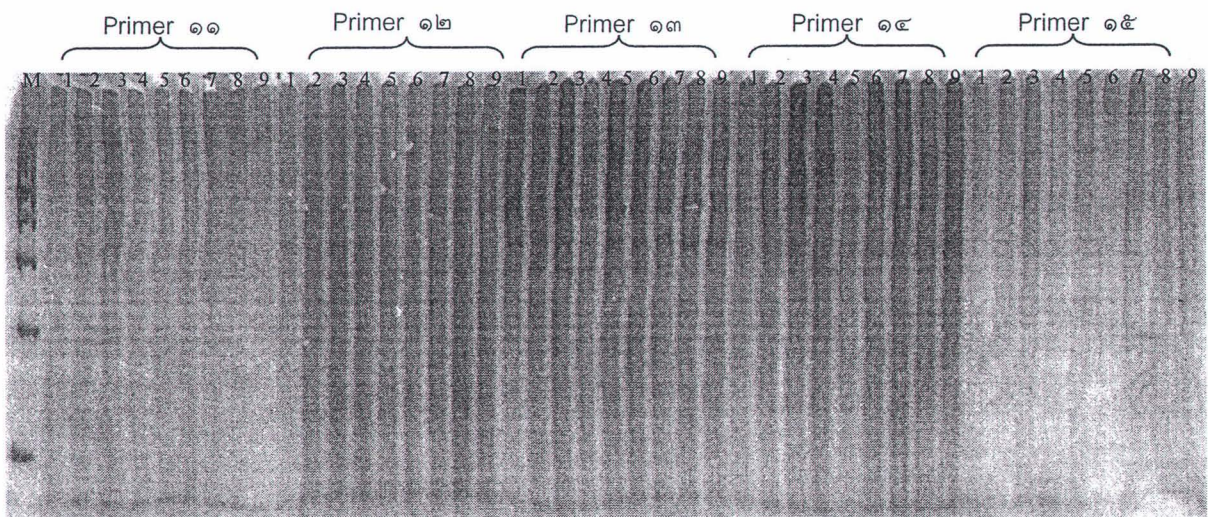
รูปที่ ๔ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ ๑-๕ จากตัวอย่างพริก

๑ = CA 1445 MM	๔ = CA 1447 MM	๓' = CA 1450 MM
๒ = CA 1445 Mm	๕ = CA 1447 Mm	๘ = CA 1450 Mm
๓ = CA 1445 mm	๖ = CA 1447 mm	๙ = CA 1450 mm



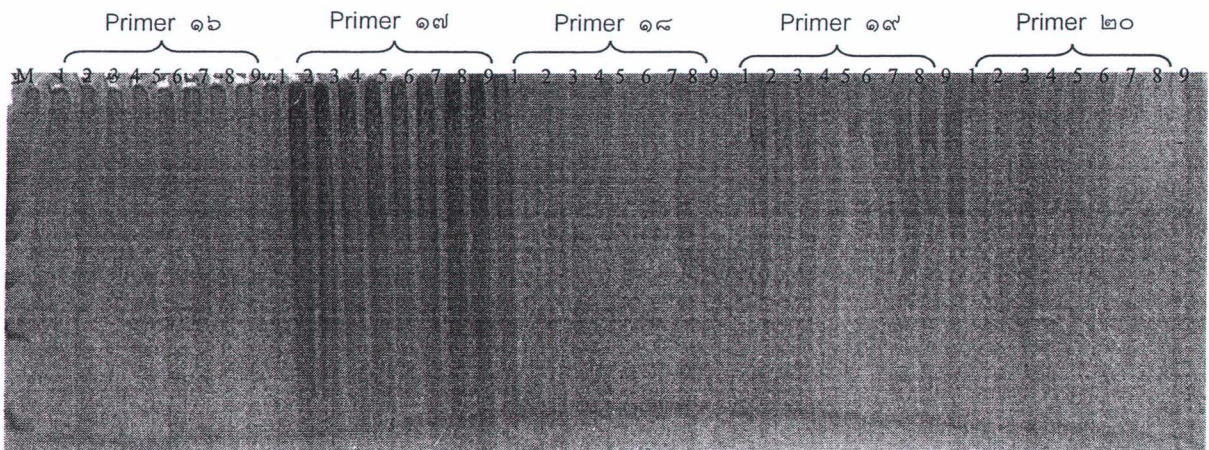
รูปที่ ๕ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ ๖-๑๐ จากตัวอย่างพริก

๑ = CA 1445 MM	๔ = CA 1447 MM	๗ = CA 1450 MM
๒ = CA 1445 Mm	๕ = CA 1447 Mm	๘ = CA 1450 Mm
๓ = CA 1445 mm	๖ = CA 1447 mm	๙ = CA 1450 m



รูปที่ ๖ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ ๑๑-๑๕ จากตัวอย่างพริก

๑ = CA 1445 MM	๔ = CA 1447 MM	๗ = CA 1450 MM
๒ = CA 1445 Mm	๕ = CA 1447 Mm	๘ = CA 1450 Mm
๓ = CA 1445 mm	๖ = CA 1447 mm	๙ = CA 1450 mm

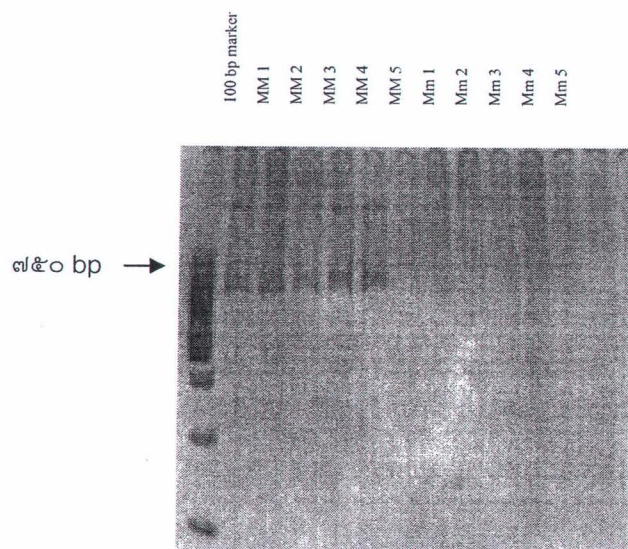


รูปที่ ๓/ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ ๑๖-๒๐ จากตัวอย่างพริก

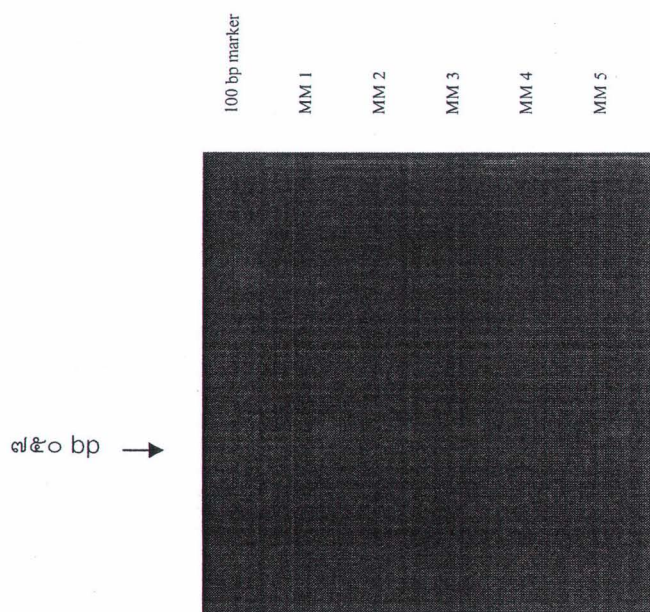
๑ = CA 1445 MM ๔ = CA 1447 MM ๓/ = CA 1450 MM
 ๒ = CA 1445 Mm ๕ = CA 1447 Mm ๘ = CA 1450 Mm
 ๓ = CA 1445 mm ๖ = CA 1447 mm ๙ = CA 1450 mm

๑.๒.๒ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแถบคัดเลือกโดยการโคลน

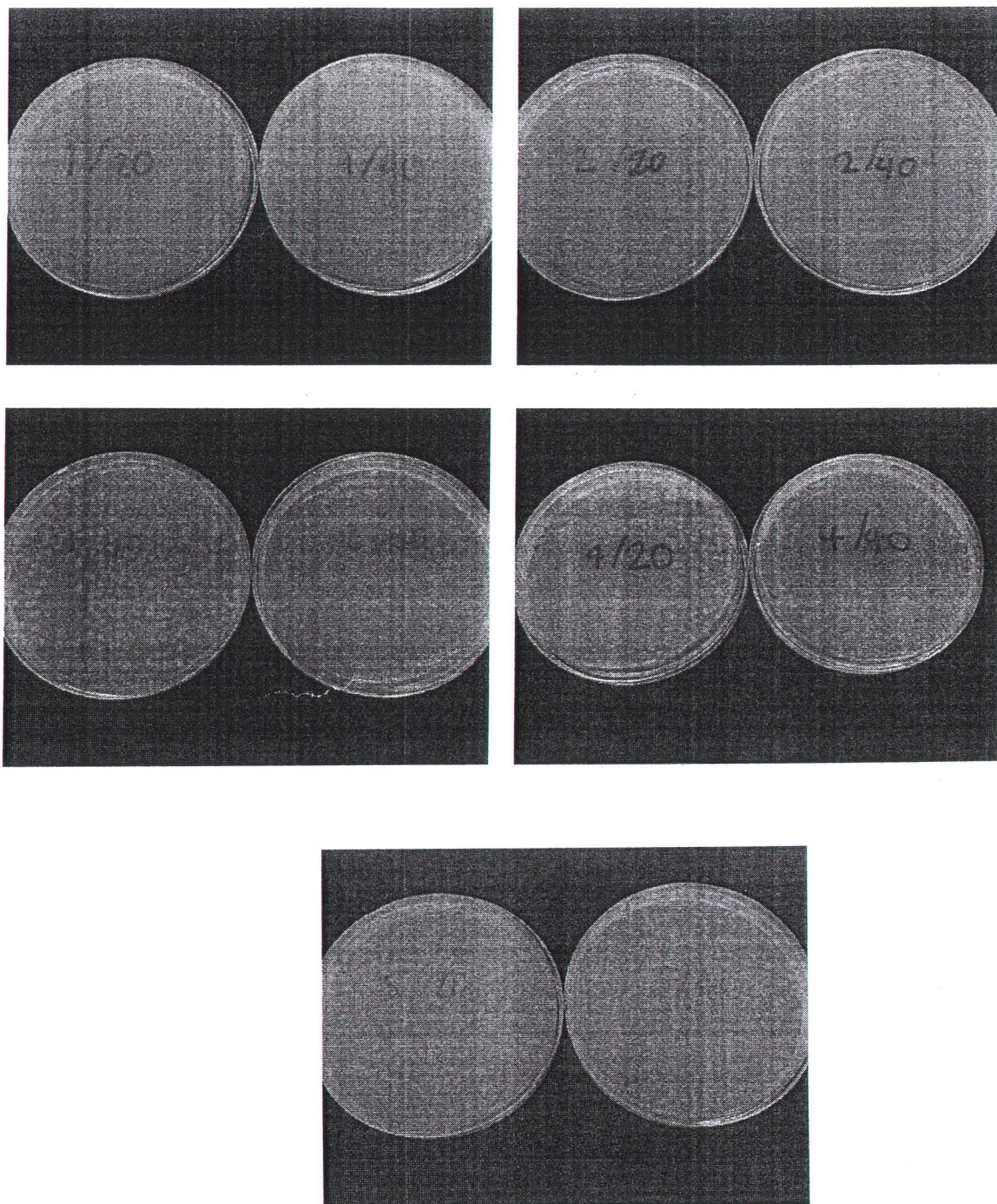
ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพริกพันธุ์ CA 1445 ๕ ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ ๓๕๐ bp เฉพาะในพันธุ์กรรม MM (รูปที่ ๘) จึงตัดแถบบังกล่าวเพื่อเพิ่มปริมาณซ้ำ พบแถบจำเพาะเพียงแถบเดียวตามขนาดที่คาดหวัง (รูปที่ ๙) จึงนำไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ และนำเข้าสู่เซลล์ ในการเลี้ยง Transformant ปริมาตร ๒๐ และ ๔๐ μ l ที่บนอาหารแข็งที่มี spectinomycin พบว่าการใช้ปริมาตร ๒๐ μ l มีการกระจายตัวของโคโลนี เป็นโคโลนีเดี่ยวได้ดีกว่าปริมาตร ๔๐ μ l (รูปที่ ๑๐) ซึ่งจะได้คัดเลือกโคโลนีเพื่อสกัดแยกดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป



รูปที่ ๘ ผลผลิตพีซีอาร์จากตัวอย่างพริกพันธุ์ CA 1445 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์จำเพาะ พัฒนา มาจาก CAPS marker โดย Kim (2005)



รูปที่ ๙ ผลผลิตพีซีอาร์ จากตัวอย่างพริกพันธุ์ CA 1445 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ด้วยไพรเมอร์ จำเพาะพัฒนา มาจาก CAPS marker โดย Kim (2005) ที่นำมาใช้เพื่อนำไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์



รูปที่ ๑๐ ผลการเลี้ยง Transformant ของตัวอย่างพริกพันธุ์ CA 1445 พันธุกรรม MM ๕
ตัวอย่าง ปริมาตร ๒๐ และ ๔๐ μ l บนอาหารแข็งที่มี spectinomycin