

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานทดลอง

##### 3.1.1 วัสดุอุปกรณ์ในแปลงทดลอง

1. พริก 2 ชนิด *C. chinense* Jacq. (KKU-P11176; พันธุ์ C) และ *C. baccatum* L. (KKU-P34021; พันธุ์ B) โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 3.1
2. วัสดุและอุปกรณ์ในการบ่มเมล็ด เพาะกล้า และการปลูก เช่น กล่องเพาะ ทรายเพาะ ถาดเพาะ พีทมอส ปูนขาวและพลาสติกคลุมแปลง เป็นต้น
3. สารเคมีกำจัด โรค และแมลง
4. ปุ๋ยเคมีเกรด 30-20-10, 15-15-15, 10-52-17, 15-0-0, 0-46-0, 0-0-60 และธาตุอาหารเสริม
5. วัสดุเตรียมแปลงปลูก ปุ๋ยคอก กากตะกอนหมักคั้นน้ำตาล ปูนโดโลไมท์
6. อุปกรณ์สำหรับการผสม เช่น คีมคีบ สำลี ค้ายสีต่าง ๆ และแอลกอฮอล์
7. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ตลับเมตร มีด ถุงซิปลง ทราย กระดาษ ไม้บรรทัด เครื่องชั่ง เวอร์เนียร์คาลิเปอร์

##### 3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

1. เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ หลอด vial ขนาด 10 ml กระจกบดวง จานแก้ว (petri plate) ขวดแก้วใส่สาร กระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์
2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น กล้องจุลทรรศน์ (Optical microscope) กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) Rotary microtome ตู้อบลมร้อน (hot air oven) เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (balance) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ทราย กรอง
3. สารเคมี ที่ใช้แบ่งออกตามงานทดลองดังรายละเอียดตามภาคผนวก

#### 3.2 วิธีดำเนินการทดลองเบื้องต้น

การทดลองครั้งนี้ ได้แบ่งงานทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ได้ดังนี้ 1) การทดลองระยะก่อนการถ่ายเรณู 2) ระยะก่อนการปฏิสนธิ และ 3) ระยะหลังการปฏิสนธิ ในแต่ละการทดลองมีการเตรียมแปลง การปลูก และการปฏิบัติเหมือนกัน ดังต่อไปนี้

ปลูกพริก 2 พันธุ์โดยย้ายปลูกเมื่อต้นกล้าอายุ 25 วัน ในสภาพแปลงทดลองหมวดพืชผัก สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 3 ซ้ำๆ ละ 20 ต้นโดยใช้ระยะปลูกระหว่างต้น 60 เซนติเมตร ระหว่างแถว 50 เซนติเมตร ขนาดแปลงกว้าง 0.8 เมตร ยาว 40 เมตร กลุ่มแปลงปลูกด้วยพลาสติกสีดำเงิน ระยะห่างระหว่างแปลง 80 เซนติเมตร

### 3.2.1 การผสมตัวเองและผสมข้ามพันธุ์

การทดลองที่ 2 และ 3 มีการผสมพันธุ์โดยทำการผสมตัวเอง 2 พันธุ์ และผสมข้าม 2 คู่ผสม วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 3 ซ้ำๆ ละ 20 ต้นต่อหนึ่งหน่วยทดลอง มี 4 สิ่งทดลอง ดังนี้

1. พริกชนิด *C. chinense* Jacq. (C) ผสมตัวเอง
2. พริกชนิด *C. baccatum* L. (B) ผสมตัวเอง
3. พริกชนิด *C. chinense* Jacq. ผสมกับ *C. baccatum* L. (C/B)
4. พริกชนิด *C. baccatum* L. ผสมกับ *C. chinense* Jacq. (B/C)

พันธุ์พริก ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ มีลักษณะทางการเกษตรที่แตกต่างกันออกไปดังต่อไปนี้

### ตารางที่ 3.1 พริกจำนวน 2 พันธุ์ ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่แตกต่างกัน

รหัส	สปีชีส์	พันธุ์	ลักษณะผล	สีผล		ที่มา
				ผลดิบ	ผลสุก	
1. KKU-P11176 (C)	<i>C. chinense</i> Jacq.	พริกชี้หนู หอมผลสั้น	ผลสั้น	เหลือง ขาว	ส้มแดง	ไทย
2. KKU-P34021 (B)	<i>C. baccatum</i> L.	PI 377522	ผลยาวรี ผิวมัน	เขียว	เหลือง	อาร์เจนตินา

### 3.3 การทดลองที่ 1 ระยะก่อนการถ่ายเรณู (pre- pollination)

#### 3.3.1 สัณฐานวิทยาของดอก

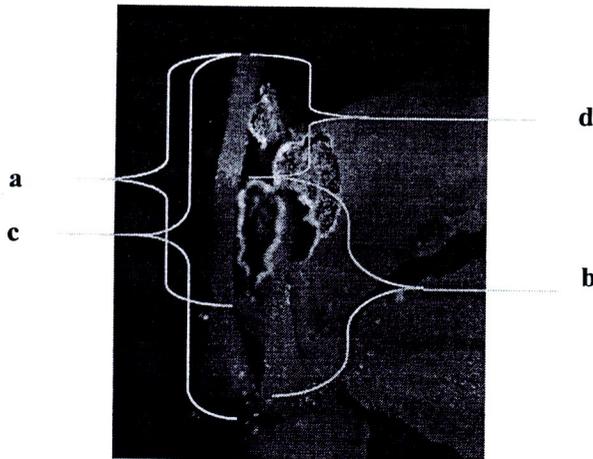
วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 3 ซ้ำๆ ละ 20 ดอก มี 2 สิ่งทดลองคือพริก พันธุ์ C และ พันธุ์ B ศึกษาลักษณะและการเจริญของดอกดังนี้

### 3.3.1.1 วิธีการ

- 1) ทำการย้ายปลูกพริกพันธุ์ C วันที่ 25 พฤษภาคม 2553 และพริกพันธุ์ B วันที่ 29 เมษายน 2553 แล้วทำการศึกษาวันแรกดอกบานหลังย้ายปลูก
- 2) ศึกษาลักษณะและการเจริญของดอก และอวัยวะสืบพันธุ์ภายในดอก
- 3) ศึกษาลักษณะของเกสรเพศผู้
- 4) ศึกษาลักษณะของเกสรเพศเมีย
- 5) วัดระยะห่างของปลายเกสรเพศเมีย (stigma) กับปลายอับเรณู (anther)

### 3.3.1.2 การบันทึกข้อมูล

- 1) วันแรกดอกบาน
- 2) ระยะเวลาการเจริญของตาดอกจนกระทั่งดอกบาน
- 3) ความกว้าง ยาว เฉลี่ยของดอกบาน (มิลลิเมตร)
- 4) จำนวน และสีของกลีบดอก
- 5) จำนวน และสีอับเรณูใน 1 ดอก
- 6) ความยาวก้านเกสรเพศเมีย (มิลลิเมตร) ดังภาพที่ 3.1(a)
- 7) ความยาวก้านชูถึงปลายอับเรณู ดังภาพที่ 3.1(b)
- 8) ความยาวยอดเกสรเพศเมียถึง โคนรังไข่ ดังภาพที่ 3.1(c)
- 9) ระยะห่างระหว่างยอดเกสรเพศเมียกับปลายอับเรณู ดังภาพที่ 3.1(d)



ภาพที่ 3.1 การบันทึกการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ภายในดอกพริก

หมายเหตุ : ความยาวก้านเกสรเพศเมีย (a); ความยาวก้านชูถึงปลายอับเรณู (b); ความยาวยอดเกสรเพศเมียถึงโคนรังไข่ (c) และระยะห่างระหว่างยอดเกสรเพศเมียกับปลายอับเรณู (d)

### 3.3.2 เปอร์เซ็นต์ความงอกเรณูและความยาวของหลอดเรณู

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design มี 3 ปัจจัย จำนวน 3 ชั้น ปัจจัยที่หนึ่ง คือระยะการบานของดอก 2 ระดับ ได้แก่ วันก่อนดอกบาน 1 วัน และวันดอกบาน ปัจจัยที่สอง คือเวลาเก็บรักษาเรณู 2 ระดับ ได้แก่ เก็บดอกไว้ในที่มีสภาพอุณหภูมิความชื้น (24 ชั่วโมง) และศึกษาทันทีที่เก็บมา (0 ชั่วโมง) ปัจจัยที่สาม คืออาหารเลี้ยงเรณู 10 ระดับ ได้แก่ น้ำกลั่น และสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack ที่มีระดับซูโครส ที่แตกต่างกัน 9 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีทั้งหมด 40 สิ่งทดลอง

#### 3.3.2.1 วิธีการ

- 1) เก็บตัวอย่างเรณูในช่วงเวลา 08.00 – 10.00 นาฬิกา เก็บตัวอย่างจากทั้งหมด 30 ต้น ๆ ละ 2 ดอก
- 2) นำไปทดสอบความงอกในห้องปฏิบัติการโดยวิธี hanging drop technique เคาะเรณูจากอับเรณูที่เก็บมาจากแปลงลงในอาหารแต่ละสูตร สูตรละ 2 ดอก ลงในขวดแก้ว
- 3) ใช้แท่งแก้วคนเพื่อให้เรณูกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นใช้ หลอดหยด (dropper) ใส่อาหารดังกล่าวไปหยดบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วนำสไลด์ไปวางคว่ำบนสไลด์หลุม
- 4) ทดสอบการตรวจนับความงอกของเรณู หลังจากการเพาะเลี้ยง 4 ชั่วโมง โดยเขย่าหลอด แล้วสุ่มจุดสารละลายในหลอดเพาะเลี้ยงมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าความยาวของหลอดเรณูงอกมีความยาวเกินครึ่งของเส้นผ่าศูนย์กลางของขนาดเรณู ให้ทำการเก็บข้อมูลโดยสุ่มนับจำนวน 6 บริเวณ ทั้งหมด 3 ชั้น

### 3.3.2.2 การบันทึกข้อมูล

- 1) เปอร์เซ็นต์ความงอกของเรณู
- 2) ความยาวของหลอดเรณู

### 3.3.3 ความพร้อมในการรับการผสมของยอดเกสรเพศเมีย

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design มี 2 ปัจจัย จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ดอก ปัจจัยที่หนึ่ง คือพันธุ์พริก มี 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ C และพันธุ์ B ปัจจัยที่สอง คือระยะการบานของดอก มี 2 ระยะคือ วันก่อนดอกบาน 1 วัน และวันดอกบาน มีทั้งหมด 4 สิ่งทดลอง

#### 3.3.3.1 วิธีการ

- 1) เก็บตัวอย่างดอกพริกทั้ง 2 พันธุ์ แล้วนำมาทดสอบทันที ตามวิธีการดัดแปลงจาก Dafni, 1992 (ภาคผนวก)

#### 3.3.3.2 การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกจำนวนยอดเกสรเพศเมียที่ย้อมติดสีน้ำเงินดำ (เปอร์เซ็นต์)

## 3.4 การทดลองที่ 2 ระยะก่อนการปฏิสนธิ (pre-fertilization)

### 3.4.1 ความเข้ากันได้ (compatibility) ของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design มี 2 ปัจจัย โดยปัจจัยที่หนึ่ง คือระยะการบานของดอก มี 2 ระยะ คือวันก่อนดอกบาน 1 วัน และวันดอกบาน และปัจจัยที่สอง คือจำนวนชั่วโมงหลังการผสมเกสร มี 4 ระดับ ที่ระยะเวลา 3, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ละระยะเวลาหลังการผสม มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ดอก มีทั้งหมด 8 สิ่งทดลอง

#### 3.4.1.1 วิธีการ

- 1) เก็บดอกจากการผสมเกสรของพริก ทั้ง 4 คู่ผสม คู่ผสมละ 48 ดอก
- 2) ตรวจสอบการเกาะติดของเรณูบนยอดเกสรเพศเมีย และการงอกของหลอดเรณูเข้าไปในก้านชูเกสรเพศเมีย ตามวิธีการดัดแปลงจาก Peter and McCollum, 1984 และ Dafni, 1992 (ภาคผนวก)

#### 3.4.1.2 การบันทึกข้อมูล

- 1) จำนวนเรณูที่งอก และจำนวนเรณูบนยอดเกสรเพศเมียในแต่ละก้านเกสรเพศเมีย (style)
- 2) นับจำนวนหลอดเรณูที่งอก (pollen tube) ในก้านเกสรเพศเมียที่มีระยะทางยาวมากกว่าครึ่งของก้านเกสรเพศเมีย



3) บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) ด้วยแสงฟลูออเรสเซนซ์

### 3.5 การทดลองที่ 3 ระยะหลังการปฏิสนธิ (post-fertilization)

#### 3.5.1 ความสามารถในการผสมติด

ศึกษาปริมาณการผสมติดผลของพริกทั้งการผสมตัวเอง และผสมข้าม โดยผสมเกสรในระยะดอกบาน 2 ระยะ คือวันก่อนดอกบาน 1 วัน และวันดอกบาน

##### 3.5.1.1 วิธีการ

- 1) เลือกดอกเพศเมียวันก่อนดอกบาน 2 วัน และวันดอกจะบานในเช้าวันรุ่งขึ้น
- 2) ทำการตอนดอก (emasculation) จากข้อ 1) เวลา 15.00 – 18.00 นาฬิกา
- 3) ทำการผสมเกสร เวลาเช้าวันรุ่งขึ้น โดยใช้ดอกต้นพ่อ 2 – 3 ดอก ผสมกับดอกต้นแม่ 1 ดอก ผสมในช่วงเวลา 06.00 - 10.00 นาฬิกา

##### 3.5.1.2 การบันทึกข้อมูล

- 1) เปอร์เซ็นต์ดอกที่ผสมติด โดยคำนวณจากจำนวนผลที่ผสมติดทุกสัปดาห์จากจำนวนดอกที่ผสมทั้งหมด จนถึงสัปดาห์ที่ 3 หลังผสม

$$\text{โดยคำนวณจาก } \frac{\text{จำนวนดอกที่ผสมติด}}{\text{จำนวนดอกที่ผสมทั้งหมด}} \times 100$$

- 2) เปอร์เซ็นต์ดอกผสมไม่ติดหลังผสม 1 สัปดาห์

$$\text{โดยคำนวณจาก } 100 - \text{เปอร์เซ็นต์ผลที่ผสมติดหลังผสม 1 สัปดาห์}$$

#### 3.5.2 ผลผลิตเมล็ดพันธุ์

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำ ๆ 10 ผล มี 4 สิ่งทดลอง คือพริกผสมตัวเอง 2 พันธุ์ และลูกผสมข้าม 2 คู่ผสม

##### 3.5.2.1 วิธีการ

- 1) เก็บผลที่อายุ 45 วัน หลังติดผลหลังการผสมด้วยมือ ในแปลงปลูก สุ่มเลือกมาทดสอบ 10 ผลต่อซ้ำ
- 2) ทำการบ่มผล 1 วัน แล้วผ่าแยกเมล็ดออก นับจำนวนเมล็ดต่อผล นำเมล็ดไปผึ่งลมไว้ 4 วัน แล้วนำไปอบในตู้อบแห้ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- 3) ชั่งน้ำหนักเมล็ดแห้งต่อผล และน้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ด

### 3.5.2.2 การบันทึกข้อมูล

- 1) จำนวนเมล็ดต่อผล
- 2) น้ำหนักเมล็ดแห้งต่อผล
- 3) น้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ด

### 3.5.3 การพัฒนาของเอ็มบริโอ

ศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอพริกผสมข้ามชนิด เปรียบเทียบกับลูกผสมตัวเอง ตั้งแต่ระยะผล 5 วัน ถึง 30 วัน หลังทำการผสมด้วยมือ

#### 3.5.4.1 วิธีการ

1) ทำการเก็บผลมาศึกษา โดยเริ่มตั้งแต่วันแรกคือวันที่ 5 ถึงวันที่ 30 หลังการผสมเกสร ระยะเวลาละ 6 ผล ตีรังผลในสาร FAA หลังจากนั้นคึงน้ำออกโดยใช้ ethyl alcohol แล้วหุ้มด้วย paraffin นำไปตัดตามขวางให้ มีความหนา 5 – 20 ไมโครเมตร ขึ้นอยู่กับความอ่อนนุ่มของเมล็ดแล้วย้อมด้วยสี fast green และ safranin จากนั้นทำสไลด์ถาวร โดยวิธีทาง microtechnique คัดแปลงตามวิธีของอัจฉรา, 2538 (ภาคผนวก)

#### 3.5.4.2 การบันทึกข้อมูล

- 1) สังเกตและจดบันทึกการพัฒนาของเอ็มบริโอ
- 2) บันทึกภาพถ่าย

### 3.5.4 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด ทั้งหมด 4 สิ่งทดลอง คือพริกผสมตัวเอง 2 พันธุ์ และลูกผสมข้าม 2 คู่ผสม

#### 3.5.3.1 วิธีการ

1) นำเมล็ดไปเพาะเพื่อตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ประกอบด้วย การทดสอบเปอร์เซ็นต์ความงอก (germination test) และอัตราเร็วการงอก (seed vigor) ISTA (1999, อ้างถึงใน ครุณี, 2545)

2) กำหนดวิธีการทดสอบและวันนับความงอก ซึ่งแบ่งนับ 2 ครั้ง คือ นับครั้งแรกที่ 7 วัน และนับครั้งที่สองที่ 14 วัน โดยวิธีการเพาะแบบ top of paper (TP) ส่วน อัตราเร็วการงอก ทำการประเมินทุกวันเป็นเวลา 14 วัน

### 3.5.3.2 การบันทึกข้อมูล

- 1) เปอร์เซ็นต์ความงอก
- 2) อัตราเร็วการงอก (ต้น/วัน)
- 3) ลักษณะต้นกล้า โดยนับจำนวนต้นกล้าปกติ และผิดปกติ (เปอร์เซ็นต์)

### 3.5.5 การเจริญของต้นกล้า

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำ มี 4 สิ่งทดลอง คือ พริกผสมตัวเอง 2 พันธุ์ และลูกผสมข้าม 2 คู่ผสม

#### 3.5.5.1 วิธีการ

1) นำเมล็ดที่งอกจากการทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (3.5.4) มาเพาะลงใน ถาด เพาะขนาด 104 หลุม

- 2) หลังจากเพาะ 25 วัน นำต้นกล้ามาทำการบันทึกผล

#### 3.5.5.2 การบันทึกข้อมูล

- 1) จำนวนต้นกล้าที่มีชีวิตรอด (ต้น)
- 2) จำนวนใบ
- 3) ความกว้างต้น (เซนติเมตร)
- 4) ความสูงต้น (เซนติเมตร)
- 5) น้ำหนักสดส่วนยอดและราก (กรัม)
- 6) น้ำหนักแห้งส่วนยอดและราก (กรัม)

### 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแบบแผนการทดลองที่ใช้คือ

การศึกษาที่ 1 Complete Randomized Design และ Factorial in Completely Randomized Design

การศึกษาที่ 2 Factorial in Completely Randomized Design

การศึกษาที่ 3 Complete Randomized Design

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ในการศึกษาที่ 1 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในการศึกษาที่ 1, 2 และ 3

### 3.7 สถานที่ทำการทดลอง

หมวดพืชผัก ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อาคารปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว และแปรรูปผลิตภัณฑ์ สาขาพืชสวน  
ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ห้องปฏิบัติการทางสรีรวิทยาสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ห้องปฏิบัติการทางชีวโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

### 3.8 ระยะเวลาทำการทดลอง

ระหว่าง เดือนพฤศจิกายน 2551 ถึง ตุลาคม 2553

1) สร้างลูกผสมชั่วที่ 1 และผสมตัวเอง ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2551 – มีนาคม 2553

2) ทำการทดลองที่ 1 - 3 ระหว่างเดือน พฤษภาคม 2553 – ตุลาคม 2553