

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พันธุ์พริก จำนวน 5 พันธุ์ คือ

1. พริก F- Habanero (FH)
2. พริก M-Habanero (MH)
3. พริกจินดา (JD)
4. พริกแม่โป่ง (MP)
5. พริกสยามฮอท (SH)

1.2 เมล็ดพริก, วัสดุเพาะกล้า, ถุงพลาสติกดำ

1.3 ปุ๋ยเคมี สูตร 46-0-0, 15-15-15, 13-13-21

1.4 สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช และแมลงศัตรูพืช

1.5 อุปกรณ์ผสมเกสร เช่น ปากคีบ สำลี ค้ายี่ แอลกอฮอล์

1.6 เครื่องบด

1.7 คู่มือ

1.8 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัด capsaicin

1.9 capsaicin standard สำหรับเทียบ ในการวิเคราะห์ HPLC

1.10 เครื่อง HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

1.11 เครื่องมือวัดชนิดต่างๆ เช่น ไม้บรรทัด, vernier calipers, เครื่องชั่ง

1.12 เครื่องแก้ว

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสายพันธุ์พ่อแม่

ทำการผสมตัวเองของสายพันธุ์พ่อแม่จำนวน 6 ชั่วรุ่น (ในการทดลองนี้ใช้เมล็ดพันธุ์ที่ชั่วลูกที่ 4) ทำการผสมตัวเองอีก 2 ชั่วลูก

2.2 การสร้างลูกผสมเดี่ยว

ปลูกพริก 5 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 2 แถว แถวละ 20 ต้น ระยะปลูก 80 x 60 เซนติเมตร คัดเลือกใช้เป็นคู่ผสม จำนวน 10 ต้น ทำการผสมแบบพบกันหมด โดยไม่มีการผสม

สลับ (half diallel) จะได้คู่ผสมทั้งหมด 15 คู่ผสม (10 คู่ผสมและผสมตัวเองของสายพันธุ์พ่อแม่อีก 5 คู่ผสม) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แผนการผสมแบบ half-diallel

พ่อแม่	FH	MH	JD	MP	SH
FH	FHFH				
MH	MHFH	MHMH			
JD	JDFH	JDMH	JDJD		
MP	MPFH	MPMH	MPJD	MPMP	
SH	SHFH	SHMH	SHJD	SHMP	SHSH

2.3 การทดสอบสายพันธุ์

ทำการทดสอบลูกผสมและพ่อแม่จำนวน 15 คู่ผสม ใน 2 พื้นที่ คือ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น และ อำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น ระยะปลูก 80 x 60 เซนติเมตร โดยเพาะกล้าจนมีอายุ 45 วัน จึงย้ายปลูก หลังจากย้ายปลูกได้ 15 วัน ใส่ปุ๋ย 46-0-0 อัตรา 25 กก./ไร่ เริ่มออกดอก ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กก./ไร่ เมื่อเริ่มติดผล ใส่ปุ๋ยสูตร 13-13-21 ในอัตรา 50 กก./ไร่ ให้น้ำประมาณ 2-3 วัน/ครั้ง กำจัดวัชพืชในแปลงปลูกในช่วงออกดอก และติดผล

การเก็บผลพริกจะเก็บพริกที่สุกแก่เต็มที่ (แดงทั้งผล 100%) โดยเก็บผลผลิตทั้งหมด 4 ครั้ง แต่แต่ละครั้งห่างกัน 15 วัน นำผลผลิตแต่ละครั้งมารวมกัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณ capsaicin

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin

การวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin โดยใช้วิธีการของ collin et al. (1995) โดยการนำพริกสุกแดงเต็มที่ มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เอาหัวผลออก นำพริกมาบให้ละเอียดทั้งผล ร่อนด้วยตะแกรงขนาด 1x1 มิลลิเมตร ชั่งพริกแห้งมา 1 กรัม แช่ในอะซิโตนไนไตร (acetonitrile) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 80 °C นาน 4 ชั่วโมง เขย่าทุก 1 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรองชนิด nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้น

มิลลิลิตร ใช้ syringe ขนาด 10 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (Shimadzu รุ่น Class VP) คอลัมน์ ODS C-18 ขนาด 4.6x250 มิลลิเมตร โดยใช้ เมทธานอล 80 : น้ำกลั่น 20 เป็นส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราการไหล (flow rate) 1.5 มิลลิลิตร/นาที ตรวจสอบปริมาณสารโดยใช้แสง UV ความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้ capsaicin มาตรฐานของ Fluka : 76320 (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) และ dihydrocapsaicin มาตรฐานของ Fluka : 37274 เข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 500, 1000, 1500 และ 2000 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm) ในเมทธานอล สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin

2.5 การบันทึกข้อมูลและการวัดผล

2.5.1 การเจริญเติบโต วัดความสูงจากพื้นดินถึงข้อส่วนที่สูงที่สุด, ความกว้างของทรงพุ่ม

2.5.2 อายุดอกบาน อายุเก็บเกี่ยว นับจากวันที่ออก 50 %

2.5.3 ขนาดผล, ความกว้าง, ความยาวผล

2.5.4 น้ำหนักผลสด, น้ำหนักผลแห้ง, น้ำหนักสดต่อต้น, น้ำหนักแห้งต่อต้น

2.5.5 จำนวนเมล็ดต่อผล น้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ด

2.5.6 ปริมาณ capsaicin

2.5.7 ผลผลิตต่อต้น, ผลผลิตต่อไร่

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

2.6.1 ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแบบแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี LSD โดยใช้โปรแกรม Statistic-V. 8

$$Y_{ij} = \mu + T_i + R_j + E_{ij}$$

เมื่อ

i = จำนวนพันธุ์ ตั้งแต่ 1,...t

J = จำนวนซ้ำ ตั้งแต่ 1,...r

Y_{ij} = ค่าสังเกตของพันธุ์ที่ i ซ้ำที่ j

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของพื้นที่ปลูก

R_j = อิทธิพลของการสุ่มของซ้ำที่ j

T_i = อิทธิพลของพันธุ์ที่ i

E_{ij} = ความคลาดเคลื่อนของพันธุ์ที่ i ซ้ำที่ j

ตารางที่ 7 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance)

Source	Df
First Location	
Replication	r-1
Varieties	(t-1)
Error	(r-1)(t-1)
Second Location	
Replication	r-1
Varieties	(t-1)
Error	(r-1)(t-1)

2.6.2 ทดสอบความเป็นเอกภาพ เมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทั้ง 2 พื้นที่แล้วก่อนจะทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมจะต้องทดสอบความเป็นเอกภาพของ variance โดยการทดสอบจากค่า error mean square ทั้ง 2 พื้นที่ปลูก โดยที่เมื่อทดสอบแล้วจะต้องมีค่าความแตกต่างไม่เกิน 3 เท่า ตามวิธีการของ Gomez & Gomez (1984)

$$F = \frac{\text{Large error mean square}}{\text{Small error mean square}}$$

2.6.3 ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมทางสถิติตามแบบแผนการทดลองแบบ RCBD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี LSD โดยใช้โปรแกรม Statistic-v.8 เพื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + L_k + T_i + R_{jk} + (L \times T)_{ik} + E_{ijk}$$

เมื่อ

i = จำนวนพันธุ์ ตั้งแต่ 1,...t

J = จำนวนซ้ำ ตั้งแต่ 1,...r

k = จำนวนพื้นที่ ตั้งแต่ 1,...l

Y_{ijk} = ค่าสังเกตของพันธุ์ที่ i ซ้ำที่ j ในพื้นที่ k

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของพื้นที่ปลูก

L_k = อิทธิพลของพื้นที่ปลูกที่ k

- R_{jk} = อิทธิพลของการสุ่มของซ้ำที่ j ในพื้นที่ k
 T_i = อิทธิพลของพันธุ์ที่ i
 $(L \times T)_{ik}$ = อิทธิพลของปฏิริยาสัมพันธ์ ระหว่างพันธุ์ที่ i กับพื้นที่ k
 E_{ijk} = ความคาดเคลื่อนของพันธุ์ที่ i ซ้ำที่ j ในพื้นที่ k

ตารางที่ 8 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนรวม (analysis of variance)

Source	Df	EMS
Location	$l-1$	$\sigma_e^2 + t\sigma_{RL}^2 + tr\sigma_L^2$
Rep within season	$l(r-1)$	$\sigma_e^2 + t\sigma_{RL}^2$
Varieties	$(t-1)$	$\sigma_e^2 + r\sigma_{LT}^2 + tr\sigma_{LT}^2 + r\sum T_{ik} - 1$
Location x Varieties	$(l-1)(t-1)$	$\sigma_e^2 + t\sigma_{LT}^2$
Pool error	$l(r-1)(t-1)$	σ_e^2
Total	$lrt-1$	

ที่มา : Eberhart และ Russell (1966, อ้างโดย รักชัย, 2534)

2.6.3 การวิเคราะห์หาความสามารถในการรวมตัว

นำลูกผสมชั่วที่ 1 มาวิเคราะห์หาความสามารถในการรวมตัว (combining ability analysis) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลลูกผสมแบบ half diallel ตามวิธีของ Griffing (1956) Method 2 Model 1 กำหนดตามวิธีการของ Varghess, (1976)

$$X_{ijk} = \mu + g_i + g_j + S_{ij} + b_k + e_{ijk}$$

เมื่อ

μ = ค่าเฉลี่ยของประชากร

g_i = อิทธิพลเนื่องมาจาก G.C.A. ของพันธุ์ที่ i

g_j = อิทธิพลเนื่องมาจาก G.C.A. ของพันธุ์ที่ j

S_{ij} = อิทธิพลเนื่องมาจาก S.C.A. ของลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์แท้ที่ i กับพันธุ์ j

b_k = อิทธิพลของซ้ำที่ k

e_{ijk} = อิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่ผูกพันกับค่าสังเกตในลำดับที่ ijk

ตารางที่ 9 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการรวมตัว

source	Df	EMS
Replication	r-1	
G.C.A.	n-1	$\sigma^2_e + 2nr(1/(n-1))\sum_i g_i^2$
S.C.A.	(n(n-1)/2)	$\sigma^2_e + 2r/(n(n-1)) \sum_i \sum_j s_{ij}^2$
Error	L(r-1)(n-1)	σ^2_e
Total	[m(n-1/2)]-1	

ที่มา : พิระศักดิ์, 2525

2.6.4 การวิเคราะห์ความดีเด่น (heterosis) ที่เกิดขึ้นในลูกผสมชั่วที่ 1 ตามวิธีการของ Rai (1979 อ้างถึงใน อรวินิตินี ซูศรี, 2546) มีวิธีการในการเปรียบเทียบ 2 วิธีการคือ

1. วัดโดยการเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของพันธุ์พ่อแม่

$$\text{Heterosis (\%)} = \frac{[(F_1 - MP)]}{MP} \times 100$$

2. วัดโดยการเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของพ่อหรือแม่ที่ดีกว่า

$$\text{Heterosis (\%)} = \frac{[(F_1 - HP)]}{HP} \times 100$$

เมื่อ F_1 = ค่าเฉลี่ยของลูกผสม

MP = ค่าเฉลี่ยของพ่อแม่

HP = ค่าเฉลี่ยของพ่อหรือแม่ที่ดีกว่า

2.6.5 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของลักษณะ ใช้วิธีการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อย่างง่าย (simple correlation coefficient) ระหว่างคู่ของลักษณะต่างๆ ในกลุ่มผสมแต่ละคู่ ตามวิธีการของ Gomez & Gomez (1984 อ้างถึงใน อริสรา ภูเด่นผา, 2545)

$$r = \frac{\sum XY}{\sqrt{(\sum X^2)(\sum Y^2)}}$$

เมื่อ

$$\sum XY = \sum_{i=1}^n (X_i - X_m)(Y_i - Y_m)$$

$$\sum X^2 = \sum_{i=1}^n (X_i - X_m)^2$$

$$\sum Y^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - Y_m)^2$$

X_i, Y_i = ค่าสังเกต X และ Y ในคู่ที่ i

X_m, Y_m = ค่าเฉลี่ยของ X และ Y

3. สถานที่ในการปฏิบัติงาน

ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
แปลงปลูกพืชของบริษัท TKR&D Co.,Ltd. อ.เมือง จ. ขอนแก่น และ อ.น้ำหนาว

จ.เพชรบูรณ์

อาคารปฏิบัติการกลางเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวทางพืชสวน ภาควิชาพืชสวน
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4. ระยะเวลาในการทดลอง

แผนการปฏิบัติงาน	ระยะเวลา
1. สร้างสายพันธุ์แท้ (pure line) (2 ช่วงรุ่น)	ต.ค. 46 - ส.ค.47
2. สร้างลูกผสม	ก.ย. 47 - มิ.ย.48
3. ทดสอบลูกผสม (2 พื้นที่)	ก.ย. 48 - เม.ย. 49
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	พ.ค. 49 - ก.ย.49
5. สรุปผลการทดลอง	ต.ค. 49 - ธ.ค.49