



รายงานโครงการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์พริกหวานทนร้อน
Breeding of hot-tolerant sweet pepper

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นางสาวทัศนีย์ ดวงแยม
Ms. Tatsanee Duangyam

ปี พ.ศ. 2564



รายงานโครงการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์พริกหวานทนร้อน
Breeding of hot-tolerant sweet pepper

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นางสาวทัศนีย์ ดวงแยม
Ms. Tatsanee Duangyam

ปี พ.ศ. 2564

คำปรารภ

โครงการปรับปรุงพันธุ์พริกหวานทนร้อนเริ่มดำเนินการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2563 สิ้นสุดในปี พ.ศ. 2564 ประกอบด้วย 2 การทดลอง ได้แก่ 1. การผสมและคัดเลือกพันธุ์พริกหวาน 2. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อสร้างพริกหวานสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้พันธุ์พริกหวานที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ และพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะทนร้อน ให้ผลผลิตสูง ปัญหาใหญ่ของการปลูกพริกหวานในประเทศ คือ ความต้องการเมล็ดพันธุ์ในแต่ละปีสูง ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่จะต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศ ต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ต่อการปลูก 1 ไร่ 17,600-19,500 บาท (3,200-3,500 ต้น/ไร่) และนับวันจะสูงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมล็ดพันธุ์ทั้งหมดเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแต่เมื่อเกษตรกรปลูกเก็บผลผลิตแล้วไม่สามารถเก็บเมล็ดไว้ปลูกในปีต่อไปได้เกษตรกรต้องสูญเสียเงินในการซื้อเมล็ดพันธุ์ทุกปี ต้นทุนการผลิตสูง การวิจัยนี้จะทำให้ได้พริกหวานลูกผสมที่เกษตรกรสามารถนำไปปลูกเป็นพันธุ์การค้า และได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีลักษณะทนร้อน และให้ผลผลิตสูง ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานโครงการวิจัยฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์แก่นักวิชาการและผู้สนใจโดยทั่วไป

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	5
ผู้วิจัย	6
บทนำ	7
บทคัดย่อ	8
1. การผสมและคัดเลือกพันธุ์พริกหวาน	10
2. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อสร้างพริกหวานสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์	22
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	34
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	37

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณะกรรมการวิชาการของสถาบันวิจัยพืชสวน รวมทั้งคณะผู้เชี่ยวชาญกรมวิชาการเกษตรทุก ๆ ท่าน ที่ช่วยพิจารณาแก้ไขการเสนอ โครงการวิจัย และขอขอบคุณคณะผู้ร่วมดำเนินงานวิจัยทุกท่าน และผู้เกี่ยวข้องอื่น ๆ ที่ได้ช่วยกันดำเนินงานวิจัยและร่วมกันแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลที่ได้ทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะสามารถเป็นประโยชน์กับนักวิชาการ และผู้สนใจได้ไม่มากนัก

ทัศนีย์ ดวงแยม
หัวหน้าโครงการวิจัย ฯ

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

ทัศนีย์ ดวงแยม	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
พรพนัช มีกุล	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย
วัชรพล เชื้อเพชร	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี
ศศิธร วรปติรังสี	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
สุธามาศ ณ น่าน	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
วิชญา ศรีสุข	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
ณิชกานต์ นเรวุฒิกุล	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
วัฒนนิกรณ์ เทพโพธา	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย
สนอง จรินทร์	สถาบันวิจัยพืชสวน

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

พื้นที่ปลูกพริกหวานมีรายงานในปี 2563 มีพื้นที่ปลูกทั้งสิ้น 1,630 ไร่ ผลผลิต 2,112 ตัน ราคาขายสูงสุดอยู่ในช่วงเดือนธันวาคมของปี ในแต่ละปีผลผลิตของพริกหวานสามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรต่อรอบประมาณ 6-7 หมื่นบาท ปัญหาใหญ่ของการปลูกพริกหวานคือ ความต้องการเมล็ดพันธุ์ในแต่ละปีสูง ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่จะต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ซึ่งนำเข้าจากประเทศเนเธอร์แลนด์ ถ้าเป็นพริกหวานสีแดง เมล็ดละ 5.60 บาท สีเหลือง 5.50 บาท ต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ต่อการปลูก 1 ไร่ 17,600-19,500 บาท (3,200-3,500 ตัน/ไร่) ในปี 2563 มีมูลค่าเมล็ดพันธุ์สูงถึง 20 ล้านบาท และนับวันจะสูงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมล็ดพันธุ์ทั้งหมดเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแต่เมื่อเกษตรกรปลูก เก็บผลผลิตแล้วไม่สามารถเก็บเมล็ดไว้ปลูกในปีต่อไปได้เกษตรกรต้องสูญเสียเงินในการซื้อเมล็ดพันธุ์ทุกปี การสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจ ประโยชน์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์เนื่องจากเป็นการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ (double haploid) ได้ภายในระยะเวลาสั้น พืชที่ได้ไม่มีการข้ามของยีน ประกอบด้วยพันธุกรรมรูปแบบต่างๆ ที่ไม่มีการกระจายตัวของลักษณะอีก (fixed recombination) ทำให้ช่วยลดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พริก ทั้งการคัดเลือกพันธุ์เพื่อนำไปใช้เป็นพ่อหรือแม่ในการผลิตลูกผสมหรือใช้เป็นประชากรในการศึกษาแผนที่โครโมโซม การวิจัยนี้จะทำให้ได้พริกหวานลูกผสมที่เกษตรกรสามารถนำไปปลูกเป็นพันธุ์การค้า และได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีลักษณะทนร้อน และให้ผลผลิตสูงที่ผ่านการคัดเลือกเพื่อให้ได้พันธุ์พริกหวานพันธุ์ใหม่สำหรับเกษตรกร

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ได้พันธุ์พริกหวานที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ และพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะทนร้อน ให้ผลผลิตสูง

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 2 การทดลองมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้พันธุ์พริกหวานที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ และพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะทนร้อน ให้ผลผลิตสูง จากการทดลองการผสมและคัดเลือกพันธุ์พริกหวาน การสร้างประชากรสำหรับการคัดเลือก โดยผสมพันธุ์พริกหวานจำนวน 7 พันธุ์กับพริกหยวก 3 พันธุ์ ได้ลูกผสมจำนวน 13 คู่ผสม ในการปลูกคัดเลือก ดำเนินการเชียงรายและกาญจนบุรี ได้พริกหวานที่สามารถเจริญเติบโต ให้ผลผลิตได้ดีในช่วงฤดูร้อนและมีลักษณะรูปทรงเหมือนพริกหวาน ได้จำนวน 3 คู่ผสมๆละ 5 สายต้น มาปลูกเพื่อทำการคัดเลือกในรุ่น F2 จำนวน 15 สายต้นๆละ 50 ต้น ได้ทั้งสิ้น 750 ต้น แยกเก็บเมล็ดแต่ละต้นเป็นสายพันธุ์ ในการปลูกคัดเลือกรุ่นที่ 3 ดำเนินการที่เชียงราย ได้พริกหวานที่คัดเลือกไว้ 75 สายพันธุ์ เพื่อปลูกคัดเลือกในช่วงที่ 4 ต่อไป

การสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์เป็นวิธีการที่มีประโยชน์ต่อปรับปรุงพันธุ์เนื่องจากเป็น การลดระยะเวลาในการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกลูกผสมช่วงที่ 1 ระหว่าง พริกหวานกับพริกหยวกเพื่อสร้างพริกหวานสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ที่มีลักษณะทนร้อนและมี ผลผลิตสูง ทำการศึกษาลักษณะของดอกพริกที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะ late-uninucleate ด้วยการ ย้อมสี DAPI แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อนำอับละอองเกสรเพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ล.ร่วมกับโคเนติน ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. มีการ พัฒนาเป็นต้นสูงสุด 2.5 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร เมื่อตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยการนับ จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คัมพบว่าต้นพริกที่เป็นดิพลอยด์เป็นต้นพริกดับเบิลแฮพลอยด์ที่เกิดจาก การเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยงมีจำนวนทั้งสิ้น 21 ต้น และต้นพริกที่เป็นต้นแฮพลอยด์ 23 ต้น อย่างไรก็ตามต้นพริกที่ได้มีความหลากหลายของลักษณะมากดังนั้นการนำต้นลูกผสม ที่ผ่านการคัดเลือกตามเกณฑ์มาแล้วอย่างน้อยช่วงหนึ่งมาทำการเพาะเลี้ยงอาจเป็นวิธีการที่จะเพิ่ม โอกาสให้ได้ต้นพริกสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะตามต้องการมากขึ้น

ABSTRACT

This research project consisted of 2 experiments with the objective of obtaining cultivars of sweet peppers that matched the cultivars and new cultivars with heat-tolerant characteristics and high yields. From the experimental mixing and selection of sweet pepper cultivars found that population formation for selection by crossing 7 varieties of sweet peppers with 3 varieties of hot peppers: 13 hybrids. In selective cultivation operate Chiang Rai and Kanchanaburi get sweet peppers that can grow yields well in the summer and has a shape like a sweet pepper. 3 pairs of 5 stalks each were planted for selection in the F2 series of 15 stalks, 50 trees each, totaling 750 plants separately. Each seed was collected separately is a species in the 3rd generation of selective cultivation, it was carried out in Chiang Rai. 75 cultivars of sweet peppers were selected for selection in the 4th period.

Pepper double haploid lines are useful as breeding material for parental lines in hybrid development. Anther cultures of the pepper F₁ hybrid of sweet pepper x bell pepper were performed. Characteristics of pepper flowers with microspores at late-uninucleate stage of development with DAPI staining and then examined with a

fluorescent microscope. The anthers were cultured on C medium supplemented with combination of 0.1 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l kinetin. The highest member of plantlets at 2.5 plantlets/100 anthers. Chloroplast count techniques from leaves of regenerated plants was be used to determine the ploidy level. The results revealed that all 23 haploid plants were obtained. All of the diploid plants were spontaneous double haploid for the total number of 21 plants. However, the resulting pepper plants have a wide variety of characteristics. Therefore, cultivating a hybrid plant that has been selected for at least some time may be a way to increase the chances of a double haploid pepper with the desired characteristics.

คณะวิทยาศาสตร์

การผสมและคัดเลือกพันธุ์พริกหวาน

Hybridization and selection of sweet pepper

ทัศนีย์ ดวงแย้ม ^{1/}	ศศิธร วรพิติรังสี ^{1/}	สุธามาต ณ น่าน ^{1/}
Tatsanee duangyam ^{1/}	Sasitorn Vorapitirangsree ^{1/}	Sutamas Na-nan ^{1/}
วิชญา ศรีสุข ^{1/}	ณิชากานต์ นเรวุฒิกุล ^{1/}	พรพนัช มีกุล ^{2/}
Witchaya Srisook ^{1/}	Nitchakarn Nareawuttikun ^{1/}	Pornpanuch Meekul ^{2/}
วัชรพล เชื้อเพชร ^{3/}	सनอง จรินทร์ ^{4/}	
Watcharaphol Chuaphet	Sanong Jarintorn ^{4/}	

คำสำคัญ (Key words) การปรับปรุงพันธุ์พืช (plant breeding) การคัดเลือก (selection) พริกหวาน (sweet pepper)

บทคัดย่อ

การทดลองมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาพันธุ์พริกหวานที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ และพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะทนร้อน ให้ผลผลิตสูง ดำเนินการทดลองตั้งแต่ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564 การสร้างประชากรสำหรับการคัดเลือก โดยผสมพันธุ์พริกหวานจำนวน 7 พันธุ์กับพริกหยวก 3 พันธุ์ ได้ลูกผสมจำนวน 13 คู่ผสมดังนี้ 'California Wonder'X'ปากคลอง191' 'California Wonder'X'มณีกาญจน์' 'California Wonder'X'มณีไทย' 'Spider X'ปากคลอง191' 'ทันเดอร์'X'ปากคลอง191' 'ทันเดอร์'X'มณีกาญจน์' 'ทันเดอร์'X'มณีไทย' 'โพลาริส1838'X'ปากคลอง191' 'โพลาริส1838'X'มณีไทย' 'Giallo'X'ปากคลอง191' 'พริกหวานจิว'X'ปากคลอง191' พริกหวานจิว'X'มณีกาญจน์' และ 'พริกหวานจิว'X'มณีไทย' ในการปลูกคัดเลือก ดำเนินการเขียนรายและกาญจน์บุรี ได้พริกหวานที่สามารถเจริญเติบโต ให้ผลผลิตได้ดีในช่วงฤดูร้อนและมีลักษณะรูปทรงเหมือนพริกหวาน ได้จำนวน 3 คู่ผสมๆละ 5 สายต้น มาปลูกเพื่อทำการคัดเลือกในรุ่น F2 จำนวน 15 สายต้นๆละ 50 ต้น ได้ทั้งสิ้น 750 ต้น แยกเก็บเมล็ดแต่ละต้นเป็นสายพันธุ์พันธุ์ ในการปลูกคัดเลือกรุ่นที่ 3 ดำเนินการที่เขียนราย ได้พริกหวานที่คัดเลือกไว้ 75 สายพันธุ์ เพื่อปลูกคัดเลือกในชั่วที่ 4 ต่อไป

^{1/} ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย 57000

^{2/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย อ.แม่สรวย จ.เชียงราย 57180

^{3/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจน์บุรี อ.เมือง จ.กาญจน์บุรี 71000

^{4/} สถาบันวิจัยพืชสวน เขตจตุจักร จ.กรุงเทพฯ 10900

Abstract

The objective of the experiment was to determine the cultivar of sweet peppers with the corresponding cultivar characteristics and new, heat-tolerant, high-yielding cultivars. Experiments were conducted from October 2019 to September 2021. Population formation for selection by crossing 7 varieties of sweet peppers with 3 varieties of hot peppers: 13 hybrids were obtained as follows: 'California Wonder'X'Pak Khlong 191' 'California Wonder'X'Manikan' 'California Wonder'X'Manee

Thai' 'Spider X'Pak Khlong 191' 'Thunder'X'Pak Khlong 191 'Thunder'X'Manikan' 'Thunder'X'Manithai' 'Polaris 1838'X'Pak Khlong 191' 'Polaris 1838'X'Manithai' "Giallo'X'Pak Klong 191', 'Pak Klong 191', 'Pak Klong 191', 'Pak Klong 191', 'Pak Klong 191' and 'Pak Klong X' Mani Thai'. In selective cultivation operate Chiang Rai and Kanchanaburi get sweet peppers that can grow yields well in the summer and has a shape like a sweet pepper. 3 pairs of 5 stalks each were planted for selection in the F2 series of 15 stalks, 50 trees each, totaling 750 plants separately. Each seed was collected separately is a species in the 3rd generation of selective cultivation, it was carried out in Chiang Rai. 75 cultivars of sweet peppers were selected for selection in the 4th period.

บทนำ

พริกหวานหรือพริกยักษ์ (bell pepper, sweet pepper) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Capsicum annuum*. L อยู่ในวงศ์ Solanaceae เช่นเดียวกับมะเขือเทศและมันฝรั่ง เป็นพริกที่มีรสเผ็ดน้อย เนื่องจากมีสารแคปไซซินต่ำ นิยมนำมาผัดหรือตกแต่งอาหารเนื่องจากมีสีสวยสดดูดี มีเบต้าแคโรทีน วิตามินซี เหล็ก และโพแทสเซียม มีทั้งสีแดง เหลือง และเขียว ในพริกหวานสีเหลืองมีวิตามินมากกว่าสีส้ม ส่วนพริกหวานสีเขียวมีวิตามินซีสูงสุด นอกจากนี้สารแคปไซซินในพริกสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ลดความเสี่ยงการเป็นโรคหลอดเลือด ต้อกระจก ช่วยระบบย่อยอาหาร ลดความดันโลหิต ช่วยการไหลเวียนของเลือด พื้นที่ปลูกพริกหวานมีรายงานในปี 2563 มีพื้นที่ปลูกทั้งสิ้น 1,630 ไร่ ผลผลิต 2,112 ตัน ราคาขายสูงสุดอยู่ในช่วงเดือนธันวาคมของปี ข้อมูลจากโครงการหลวงปางค่า ตำบลผาช้างน้อย อำเภอปาง จังหวัดพะเยา ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรในพื้นที่ปลูกพริกหวาน ซึ่งสามารถทำให้เกษตรกรมีอาชีพและมีรายได้เป็นอย่างดี สามารถจำหน่ายได้กิโลกรัมละ 60-70 บาทและในแต่ละปีผลผลิตของพริกหวานสามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรต่อรอบประมาณ 6-7 หมื่นบาท (สถานีวิทยุกระจายเสียงแห่งประเทศไทยจังหวัดพะเยา, 2560)

ปัญหาใหญ่ของการปลูกพริกหวานในประเทศ คือ ความต้องการเมล็ดพันธุ์ในแต่ละปีสูง ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่จะต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ซึ่งนำเข้าจากประเทศเนเธอร์แลนด์ ถ้าเป็นพริกหวานสีแดงเมล็ดละ 5.60 บาท สีเหลือง 5.50 บาท ต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ต่อการปลูก 1 ไร่ 17,600-19,500 บาท (3,200-3,500 ตัน/ไร่) ในปี 2563 มีมูลค่าเมล็ดพันธุ์สูงถึง 20 ล้านบาท และนับวันจะสูงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมล็ดพันธุ์ทั้งหมดเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแต่เมื่อเกษตรกรปลูก เก็บผลผลิตแล้วไม่สามารถเก็บเมล็ดไว้ปลูกในปีต่อไปได้เกษตรกรต้องสูญเสียเงินในการซื้อเมล็ดพันธุ์ทุกปี ต้นทุนการผลิตสูง การวิจัยนี้จะทำให้ได้พริกหวานลูกผสมที่เกษตรกรสามารถนำไปปลูกเป็นพันธุ์การค้า และได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีลักษณะทนร้อน และให้ผลผลิตสูง

ระเบียบวิธีการวิจัย

- อุปกรณ์ : พริกหวาน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ California Wonder Spider ทันเดอร์ อิตาลี (สีเหลือง) เวก้า 1288 โพลาริส 1838 พริกหวานจิว พริกหยวกปากคลอง 191 พริกหยวกมณีไทย พริกหยวกมณีกาญจน์ ถูที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุอาหาร ปุ๋ยคอก ปุ๋ยเคมี อุปกรณ์ในการผสมพันธุ์พริก การบันทึกข้อมูล เครื่องชั่ง สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

- วิธีการ ไม่มีการวางแผนการทดลอง นำเมล็ดพริกหวานที่ผสมได้แล้ว อย่างน้อย 6- 8 คู่ผสม ทำการปลูกคัดเลือกอย่างน้อย 7 รุ่น เพื่อให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ปลูกพริกให้มีช่วงการออกดอกเหมาะสมกับการผสม โดยนำเมล็ดพันธุ์พริกแช่น้ำเปล่า นาน 1 คืน นำเมล็ดพริกมาห่อผ้าขาวบางชุบน้ำทิ้งไว้ 1 คืน หวานเมล็ดลงบนแปลงเพาะ เมื่อต้นกล้าแตกใบแรกหรือประมาณ 7 วัน ย้ายมาเพาะต่อในภาตหลุมนาน 25-30 วัน
2. เตรียมพื้นที่ปลูกพริก โดยการไถและพรวนดินทิ้งไว้ 1 เดือนก่อนปลูก
3. ปลูกพริกหวานอย่างน้อย 50 ต้นต่อพันธุ์ในแปลงทดลองในโรงเรือนชั่วคราวที่มีการพรางแสง 50 % โดยใช้ระยะปลูก 50 x 100 เซนติเมตร แถวคู่ระยะระหว่างแปลงย่อย 100 ซม. และระยะระหว่างพันธุ์ 1 เมตร
4. ทำการผสมพันธุ์โดยมีขั้นตอนดังนี้
การเตรียมต้นที่จะใช้เป็นต้นพ่อ (ก่อนการผสม 1 วัน)
- เก็บดอกพริกโดยเลือกดอกที่จะบานในวันถัดไป เด็ดกลีบดอกสีขาวออกให้เหลือเกสรตัวผู้ ใช้ตาข่ายร่อนเกสรตัวผู้ลวดตาข่าย
- เก็บเกสรตัวผู้ห่อกระดาษใส่ใน silica gel เพื่อให้ดูดความชื้นออกจากเกสร ทิ้งไว้ 1 คืน เมื่อเกสรแห้งนำไปใส่ในภาชนะที่มีผ้าขาวบางปิดไว้ เคาะเอาเฉพาะเกสรตัวผู้
การเตรียมต้นที่จะใช้เป็นต้นแม่ (ก่อนการผสม 1 วัน) โดยใช้คีมคีบเกสรตัวผู้ออกจากดอก
- วันที่ทำการผสม นำเกสรตัวผู้ที่เตรียมไว้ใส่ในอุปกรณ์ผสมพันธุ์ และปลายเกสรตัวเมียในดอกที่เจริญเต็มที่
- ทำการผสมอย่างน้อย 10 ดอกต่อต้น ทำเครื่องหมายไว้เพื่อป้องกันการผสมซ้ำโดยคลุมถุงสีขาว
5. หากผสมติด เมื่อผลที่ผสมแก่จัดจนสุก เก็บเมล็ดแต่ละต้นไปปลูกเพื่อคัดเลือก
6. เก็บเมล็ดลูกผสม F1 แต่ละต้นที่คัดเลือกได้ นำเมล็ดไปเพาะ หลังงอกนำไปปลูกในฤดูถัดไป
7. ดำเนินการปลูกเมล็ด F2 จำนวน 15 สายพันธุ์ๆละ 50 ต้น คัดเลือกต้นที่การเจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตดี และตรงตามเกณฑ์ 10 % (75 ต้น) ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดแยกต้น ได้เมล็ดชั่วที่ 3 ดำเนินการปลูก และคัดเลือกจนได้เมล็ด F6 อย่างน้อย 6-8 สายพันธุ์ในปี 2567

หลักเกณฑ์การคัดเลือกพันธุ์พริกหวาน

1. ผลเรียบ ผิวมัน สมบูรณ์ มีก้านติดที่ขั้วผลผลมีรูปร่างเหมือนพริกหวาน
2. ผลผลิตสดเท่ากันหรือมากกว่าพริกหวานพันธุ์การค้า
3. สามารถเจริญเติบโต ให้ผลผลิตดีในสภาพอากาศที่ร้อน และสามารถปลูกในพื้นที่ราบได้

การบันทึกข้อมูล

1. วันปฏิบัติการต่าง ๆ เช่น วันเพาะกล้า วันออกดอก เป็นต้น
2. ข้อมูลการเจริญเติบโต เช่น ความสูงต้น ขนาดทรงพุ่ม รวมทั้งน้ำหนักของผลผลิต

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

สถานที่ - ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จ.เชียงราย

- ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี

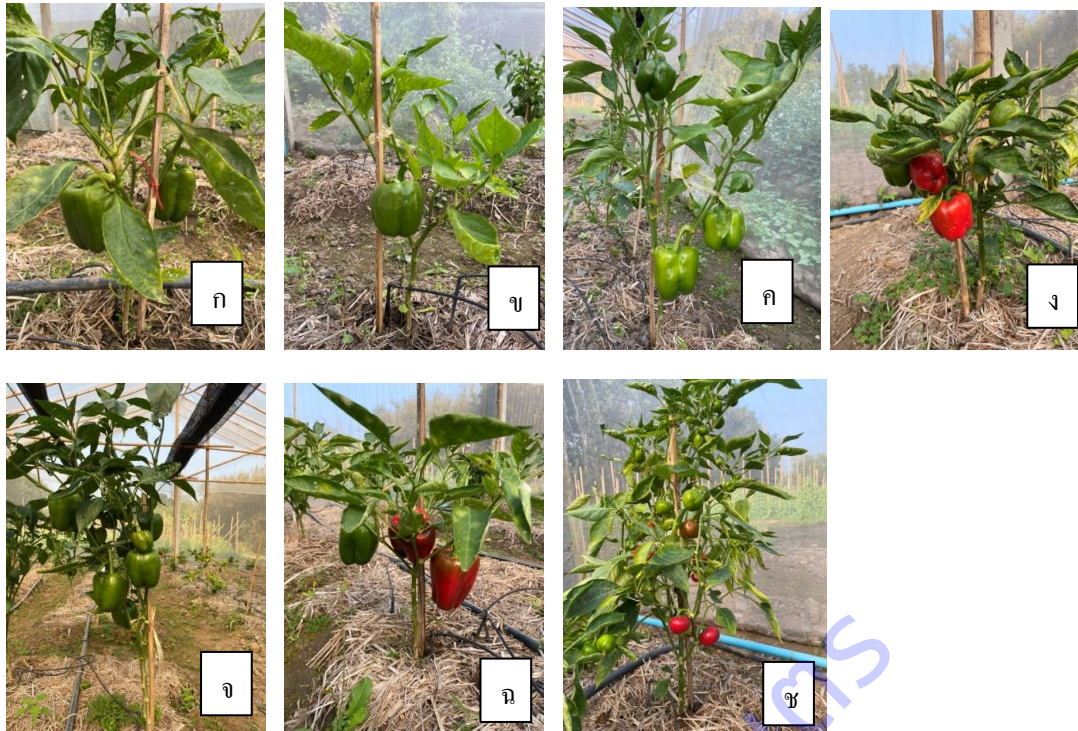
ระยะเวลา	ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์	สถานที่ดำเนินการ
ปี 2563	- ปลูกพริกหวานพันธุ์พ่อแม่ พันธุ์แม่ และทำการผสมข้าม (ได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1) F1 - คัดเลือกคู่ผสมที่ให้ลักษณะตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ ได้ 3 คู่ผสม	ศวส.ชร. ศวพ.กาญจนบุรี
ปี 2564 (ปลูกปีละ 2 ครั้ง)	- ปลูก F1 ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดได้ F2 - ปลูก F2 15 สายพันธุ์ๆละ 50 ต้น ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดได้ F3	ศวส.ชร.และศวพ.กาญจนบุรี
ปี 2565 (ปลูกปีละ 2 ครั้ง)	- ปลูก F3 60 สายพันธุ์ๆละ 20 ต้น ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดได้ F4 - ปลูก F4 120 สายพันธุ์ๆละ 20 ต้น ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดได้ F5	ศวส.ชร.
ปี 2566 (ปลูกปีละ 2 ครั้ง)	- ปลูก F5 10ต้น/สายพันธุ์ ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดแยกต้น ได้ F6 - ได้เมล็ด F6 อย่างน้อย 6-8 สายพันธุ์ - เปรียบเทียบพันธุ์ ปลูก F6 อย่างน้อย 6-8 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 1 พันธุ์	ศวส.ชร. ศวส.ชร., และศวพ.กาญจนบุรี
ปี 2567	- ปลูกเปรียบเทียบพันธุ์กับพันธุ์การค้า ซ้ำอีก 1 ครั้ง - เสนอขึ้นทะเบียนรับรองพันธุ์เป็นพันธุ์แนะนำอย่างน้อย 1 สายพันธุ์	ศวส.ชร., และศวพ.กาญจนบุรี ศวส.ชร.

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการทดลองปีที่1 (ปี 62/63)

การสร้างประชากรสำหรับการปลูกคัดเลือก

ปลูกพริกหวานสายพันธุ์พ่อแม่ในโรงเรือน จำนวน 10 พันธุ์ ต้นพริกเริ่มออกดอกเมื่อมีอายุต้นประมาณ 60 วัน โดยจะผสมพันธุ์พริก โดยใช้พริกหวานเป็นพันธุ์แม่จำนวน 7 พันธุ์ คือ California Wonder, Spider, ทันเดอร์, อิตาลี(สีเหลือง), อิตาลี(สีแดง) ,เวก้า 1288, โพลาริส 1838 และพริกหวานจิ๋ว (ภาพที่ 1) ใช้พริกหยวกเป็นพันธุ์พ่อจำนวน 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ปากคลอง 191, มณีไทย และ มณีกาญจน์ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 แสดงต้นพริกหวานอายุต้น 120 วัน ปลูก ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

- ก. พันธุ์ทันเดอร์ ข. พันธุ์ California Wonder ค. พันธุ์อิตาลี(เหลือง) ง. พันธุ์ Spider
 จ. พันธุ์โพลาริส 1838 ฉ. พันธุ์เวก้า 1288 ช. พันธุ์พริกหวานจิ๋ว



ภาพที่ 2 แสดงต้นพริกหยวกสายพันธุ์พ่ออายุต้น 120 วัน ปลูก ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

- ก. พันธุ์มณีกาญจน์ ข. พันธุ์ปากคลอง ค. พันธุ์มณีไทย ง. พันธุ์เจียไต๋

การสร้างลูกผสมชั่วที่ 1

หลังจากทำการผสมพริกหวานทุกคู่ผสม เมื่อผลพริกหวานเปลี่ยนสี สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ได้ 13 คู่ผสม ดังนี้ ‘California Wonder’X‘ปากคลอง191’ ‘California Wonder’X‘มณีกาญจน์’ ‘California Wonder’X‘มณีไทย’ ‘Spider X‘ปากคลอง191’ ‘ทันเดอร์’X‘ปากคลอง191’ ‘ทันเดอร์’X‘มณีกาญจน์’ ‘ทันเดอร์’X‘มณีไทย’ ‘โพลาริส1838’X‘ปากคลอง191’ ‘โพลาริส1838’X‘มณีไทย’ ‘Giallo’X‘ปากคลอง191’ ‘พริกหวานจิ๋ว’X‘ปากคลอง191’ พริกหวานจิ๋วX‘มณีกาญจน์’ และ ‘พริกหวานจิ๋ว’X‘มณีไทย’ (ตารางที่ 1) และสามารถเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ของแต่ละคู่ผสมได้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 คู่ผสมระหว่างพริกหวานสายพันธุ์แม่และพริกหยวกสายพันธุ์พ่อ ณ ศูนย์วิจัยพืชสวน เชียงรายปี 2562/63

พันธุ์แม่ \ พันธุ์พ่อ	‘ปากคลอง191’	‘มณีกาญจน์’	‘มณีไทย’
‘California Wonder’	/	/	/
‘Spider’	/	x	x
‘ทันเดอร์’	/	/	/
‘เวก้า1288’	x	x	x
‘โพลาริส1838’	/	x	/
‘Giallo’	/	x	x
พริกหวานจิ๋ว	/	/	/

/ หมายถึง สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ได้ x หมายถึงไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ได้

ตารางที่ 2 จำนวนเมล็ดจากคู่ผสมระหว่างพริกหวานสายพันธุ์แม่และพริกหยวกสายพันธุ์พ่อที่ผสมได้ ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ปี 2562/63

คู่ผสมที่ได้	จำนวนเมล็ดที่ได้ (เมล็ด)
‘California Wonder’ x ‘ปากคลอง’	100
‘California Wonder’ x ‘มณีกาญจน์’	125
‘California Wonder’ x ‘มณีไทย’	210
‘Spider’ x ‘ปากคลอง’	120
‘ทันเดอร์’ x ‘ปากคลอง’	100
‘ทันเดอร์’ x ‘มณีกาญจน์’	120
‘ทันเดอร์’ x ‘มณีไทย’	100
‘โพลาริส1838’ x ‘ปากคลอง’	215
‘โพลาริส1838’ x ‘มณีไทย’	225
‘Giallo’ x ‘ปากคลอง’	100
‘พริกหวานจิ๋ว’ x ‘ปากคลอง191’	120
‘พริกหวานจิ๋ว’ x ‘มณีกาญจน์’	220
‘พริกหวานจิ๋ว’ x ‘มณีไทย’	145

ตารางที่ 3 แสดงรหัสที่ใช้สำหรับคู่ผสมระหว่างพริกหวานสายพันธุ์แม่และพริกหยวกสายพันธุ์พ่อที่ผสมได้

คู่ผสมที่ได้	รหัส
'California Wonder' x 'ปากคลอง'	SP01
'California Wonder' x 'มณีกาญจน์'	SP02
'California Wonder' x 'มณีไทย'	SP03
'Spider' x 'ปากคลอง'	SP04
'ทันเดอร์' x 'ปากคลอง'	SP05
'ทันเดอร์' x 'มณีกาญจน์'	SP06
'ทันเดอร์' x 'มณีไทย'	SP07
'โพลาริส1838' x 'ปากคลอง'	SP08
'โพลาริส1838' x 'มณีไทย'	SP09
'Giallo' x 'ปากคลอง'	SP10
'พริกหวานจิ๋ว' x 'ปากคลอง191'	SP11
'พริกหวานจิ๋ว' x 'มณีกาญจน์'	SP12
'พริกหวานจิ๋ว' x 'มณีไทย'	SP13

ผลการทดลองปีที่2 (ปี 63/64)

การคัดเลือกพันธุ์พริกหวานช่วงที่ 2

จากข้อมูลผลผลิตของพริกหวานลูกผสมช่วงที่ 1 ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย พบว่า คู่ผสมที่ให้ผลผลิตตั้งแต่ 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ ได้แก่ SP01 SP02 SP10 SP11 SP12 และ SP13 (ตารางที่ 4) และข้อมูลผลผลิตของพริกหวานลูกผสมช่วงที่ 1 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี พบว่า คู่ผสมที่ให้ผลผลิตตั้งแต่ 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ ได้แก่ SP11 SP12 และ SP13 (ตารางที่ 5)

หลังจากปลูกต้นพริกหวานลูกผสมช่วงที่ 1 ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ได้จำนวน 13 คู่ผสม และที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี ได้จำนวน 7 คู่ผสม ได้ทำการคัดเลือกคู่ผสมตามเกณฑ์การคัดเลือกที่ตั้งไว้ โดยการคัดเลือกในเบื้องต้นจะพิจารณาจากต้นที่สามารถเจริญเติบโตให้ผลผลิตได้ดีทั้ง 2 สถานที่ และรูปร่างลักษณะเหมือนพริกหวาน จึงได้คู่ผสมจำนวน 3 คู่ผสมที่มีลักษณะตามเกณฑ์มากที่สุด ได้แก่ 1 SP11 SP12 และ SP13 และได้นำเมล็ดพริกหวานจากต้นลูกผสมช่วงที่ 1 ที่คัดเลือกแล้ว จำนวน 3 คู่ผสมๆละ 5 สายต้น มาปลูกเพื่อทำการคัดเลือกในรอบ F2 จำนวน 15 สายต้นๆละ 50 ต้น ได้ทั้งสิ้น 750 ต้น (ตารางที่ 6และ7) แยกเก็บเมล็ดแต่ละต้นเป็นสายพันธุ์

การคัดเลือกพันธุ์พริกหวานช่วงที่ 3

ปลูกต้นพริกหวานลูกผสมช่วงที่ 3 จำนวน 750 สายพันธุ์ ได้ทำการคัดเลือกคู่ผสมที่มีรูปร่างลักษณะเหมือนพริกหวาน คัดเลือกไว้ 75 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8)เพื่อปลูกคัดเลือกในช่วงที่ 4 ต่อไป

ตารางที่ 4 ขนาดผล น้ำหนักผล และผลผลิตของพริกหวานช่วงที่ 1 ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

รหัส	ขนาดผล(ซม.)		น้ำหนักผล (กรัม)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)
	กว้าง	ยาว		
SP01	5.1	7.2	110	1,145
SP02	4.8	6.7	140	1,220
SP03	4.6	7.4	120	990
SP04	5.3	7.6	80	430
SP05	5.2	6.1	100	560
SP06	6.3	7.2	150	870
SP07	4.2	8.6	120	652
SP08	3.5	7.2	110	984
SP09	4.7	6.5	140	856
SP10	5.2	8.3	110	1,256
SP11	4.5	5.2	72	1,012
SP12	5.8	6.8	91	1,140
SP13	6.3	6.5	94	1,264

ตารางที่ 5 ขนาดผล น้ำหนักผล และผลผลิตของพริกหวานช่วงที่ 1 ณ ศวพ.กาญจนบุรี

รหัส	ขนาดผล(ซม.)		น้ำหนักผล (กรัม)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)
	กว้าง	ยาว		
SP05	4.2	7.8	130	870
SP06	3.8	8.1	140	560
SP07	4.3	6.5	110	780
SP09	5.2	6.3	120	820
SP11	4.0	5.6	85	1,210
SP12	3.8	6.2	98	1,024
SP13	4.3	5.2	74	1,040

ตารางที่ 6 ขนาดผล น้ำหนักผล และผลผลิตของพริกหวานช่วงที่ 2 ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

รหัส	ขนาดผล(ซม.)		น้ำหนักผล (กรัม)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)
	กว้าง	ยาว		
SP11-1	4.4	6.4	75	1,237
SP11-2	3.5	5.4	98	1,093
SP11-3	5.8	5.3	74	1,123
SP11-4	4.4	4.9	85	1,460
SP11-5	3.9	5.3	85	1,238
SP12-1	4.5	5.6	87	1,244
SP12-2	4.6	5.3	78	1,394
SP12-3	4.0	6.4	84	1,049
SP12-4	5.3	5.4	95	1,024
SP12-5	5.8	5.6	79	965
SP13-1	3.7	5.9	87	1,207
SP13-2	4.3	6.2	75	1,545
SP13-3	4.7	5.6	74	1,235
SP13-4	4.9	6.4	78	1,043
SP13-5	5.3	5.7	89	1,021

ตารางที่ 7 ขนาดผล น้ำหนักผล และผลผลิตของพริกหวานลูกผสมช่วงที่ 2 ณ ศวพ.กาญจนบุรี

รหัส	ขนาดผล(ซม.)		น้ำหนักผล (กรัม)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)
	กว้าง	ยาว		
SP11-1	5.2	6.7	75	983
SP11-2	4.3	5.9	78	844
SP11-3	4.6	5.3	89	1,103
SP11-4	4.3	5.2	87	1,021
SP11-5	5.6	6.7	77	1,167
SP12-1	4.2	6.2	72	958
SP12-2	4.6	5.7	70	873
SP12-3	5.8	6.8	77	854
SP12-4	5.4	6.3	97	1,034
SP12-5	4.7	5.6	79	982
SP13-1	5.7	6.4	74	1,012
SP13-2	5.6	7.4	72	1,123
SP13-3	7.4	7.8	70	943

SP13-4	5.7	6.5	82	1,003
SP13-5	6.4	7.5	93	1,211

ตารางที่ 8 ขนาดผล น้ำหนักผล และผลผลิตของพริกหวานลูกผสมชั่วที่ 3 ณ ศูนย์วิจัยพืชสวน เชียงราย

รหัส	ขนาดผล(ซม.)		น้ำหนักผล (กรัม)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)
	กว้าง	ยาว		
SP11-1-1	4.2	6.2	87	1,345
SP11-1-5	3.8	5.3	85	1,043
SP11-1-33	3.9	6.2	84	1,242
SP11-1-36	4.3	6.1	85	1,450
SP11-1-46	4.3	5.6	73	1,201
SP11-2-2	4.7	6.4	74	1,223
SP11-2-11	4.8	6.3	78	1,300
SP11-2-33	5.3	6.7	68	1,216
SP11-2-41	4.7	6.2	89	1,033
SP11-2-47	4.8	5.8	79	894
SP11-3-7	4.2	6.1	86	1,012
SP11-3-9	4.4	5.6	89	1,145
SP11-3-24	4.3	6.3	74	1,400
SP11-3-36	4.6	6.3	62	1,100
SP11-3-40	4.8	6.8	78	928
SP11-4-4	4.3	6.7	78	878
SP11-4-16	4.7	5.6	78	985
SP11-4-29	5.6	6.7	65	897
SP11-4-35	5.3	6.3	77	1,326
SP11-4-39	5.2	6.4	86	1,200
SP11-5-2	4.7	5.7	78	873
SP11-5-11	4.3	5.9	89	830
SP11-5-17	4.5	6.4	76	940
SP11-5-21	3.4	6.4	67	1,033
SP11-5-25	6.2	7.5	65	1,490
SP12-1-4	4.5	6.5	84	1,393
SP12-1-8	4.1	5.2	88	985
SP12-1-24	4.6	5.3	68	870
SP12-1-38	3.7	4.4	69	1,090

ตารางที่ 8 (ต่อ)

รหัส	ขนาดผล(ซม.)		น้ำหนักผล (กรัม)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)
	กว้าง	ยาว		
SP12-1-48	5.0	5.6	76	1,022
SP12-2-3	4.1	5.6	78	980
SP12-2-17	4.3	6.3	87	1,130
SP12-2-38	4.2	6.5	86	1,021
SP12-2-41	5.2	6.9	85	1,157
SP12-2-47	4.1	5.8	78	1,290
SP12-3-7	4.1	5.7	79	940
SP12-3-18	5.3	6.5	83	900
SP12-3-29	5.1	6.9	95	1,034
SP12-3-35	4.2	5.8	84	1,033
SP12-3-46	5.2	6.7	79	1,134
SP12-4-1	5.1	6.8	76	1,230
SP12-4-7	5.7	6.8	84	1,356
SP12-4-10	6.4	6.9	94	1,029
SP12-4-15	6.2	7.5	87	1,211
SP12-4-26	5.4	6.5	78	943
SP12-4-29	4.3	7.4	85	865
SP12-4-35	4.5	5.4	86	856
SP12-4-37	5.1	5.4	76	790
SP12-4-48	5.3	6.8	67	970
SP12-4-50	4.3	5.6	86	985
SP13-1-8	4.2	5.4	84	1,033
SP13-1-17	4.1	5.6	64	1,094
SP13-1-43	3.7	4.8	68	1,210
SP13-1-46	3.8	4.5	78	1,370
SP13-1-49	3.4	5.4	58	980
SP13-2-7	4.3	5.8	87	879
SP13-2-15	4.3	5.2	65	986
SP13-2-23	4.1	5.3	67	750
SP13-2-31	4.6	5.7	63	760

ตารางที่ 8 (ต่อ)

รหัส	ขนาดผล(ซม.)		น้ำหนักผล (กรัม)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)
	กว้าง	ยาว		
SP13-2-41	5.1	6.8	76	1,220
SP13-3-5	4.1	6.7	75	889
SP13-3-7	4.2	6.3	78	1,160
SP13-3-23	4.0	6.7	86	1,204
SP13-3-25	5.2	6.4	76	1,120
SP13-3-31	4.1	5.6	73	988
SP13-4-8	4.1	5.7	67	1,000
SP13-4-19	5.3	6.4	69	980
SP13-4-20	5.1	6.8	79	876
SP13-4-22	4.4	5.6	85	985
SP13-4-27	5.2	7.3	83	1,000
SP13-5-6	5.3	6.4	78	1,124
SP13-5-22	6.2	6.4	70	980
SP13-5-25	5.2	6.8	78	1,100
SP13-5-43	6.1	6.8	87	1,210
SP13-5-50	5.7	7.2	83	1,100

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การผสมพันธุ์พริกหวาน 7 พันธุ์และพริกหยวก 3 พันธุ์ สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ได้ 13 คู่ผสม ดังนี้ ‘California Wonder’X‘ปากคลอง191’ ‘California Wonder’X‘มณีกาญจน์’ ‘California Wonder’X‘มณีไทย’ ‘Spider X‘ปากคลอง191’ ‘ทันเดอร์’X‘ปากคลอง191’ ‘ทันเดอร์’X‘มณีกาญจน์’ ‘ทันเดอร์’X‘มณีไทย’ ‘โพลาริส1838’X‘ปากคลอง191’ ‘โพลาริส1838’X‘มณีไทย’ ‘‘Giallo’X‘ปากคลอง191’ ‘พริกหวานจิว’X‘ปากคลอง191’ พริกหวานจิวX‘มณีกาญจน์’ และ ‘พริกหวานจิว’X‘มณีไทย’ ในการปลูกคัดเลือก ดำเนินการเชิงรายและกาญจนบุรี ได้พริกหวานที่สามารถเจริญเติบโต ให้ผลผลิตได้ดีในช่วงฤดูร้อนและมีลักษณะรูปทรงเหมือนพริกหวาน ได้จำนวน 3 คู่ผสมๆละ 5 สายต้น มาปลูกเพื่อทำการคัดเลือกในรุ่น F2 จำนวน 15 สายต้นๆละ 50 ต้น ได้ทั้งสิ้น 750 ต้น แยกเก็บเมล็ดแต่ละต้นเป็นสายพันธุ์พันธุ์ ในการปลูกคัดเลือกรุ่นที่ 3 ดำเนินการที่เชิงราย ได้พริกหวานที่คัดเลือกไว้ 75 สายพันธุ์ เพื่อปลูกคัดเลือกในชั่วที่ 4 ต่อไป

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อสร้างพริกหวานสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์

Anther culture to produce double haploid sweet pepper system

พรพนัช มีกุล^{1/} วัฒนนิกรณ เทพโพธา^{1/} ทศนีย์ ดวงแยม^{2/}
Pornpanuch Meekul^{1/} Wattananikorn Theppota^{1/} Tatsanee duangyam^{2/}
ศศิธร วรปิติรังสี^{2/} สุธามาศ ณ น่าน^{2/}
Sasitorn Vorapitirangsree^{2/} Sutamas Na-nan^{2/}

คำสำคัญ (Key words) การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (Anther culture) ดับเบิลแฮพลอยด์ (double haploid) พริกหวาน (sweet pepper)

บทคัดย่อ

การสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์เป็นวิธีการที่มีประโยชน์ต่อปรับปรุงพันธุ์เนื่องจากเป็น การลดระยะเวลาในการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง พริกหวานกับพริกหยวกเพื่อสร้างพริกหวานสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ที่มีลักษณะทนร้อนและมี ผลผลิตสูง ทำการศึกษาลักษณะของดอกพริกที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะ late-uninucleate ด้วยการ ย้อมสี DAPI แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อนำอับละอองเกสรเพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ล.ร่วมกับไคเนติน ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. มีการ พัฒนาเป็นต้นสูงสุด 2.5 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร เมื่อตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยการนับ จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คัมพบว่าต้นพริกที่เป็นดิพลอยด์เป็นต้นพริกดับเบิลแฮพลอยด์ที่เกิดจาก การเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยงมีจำนวนทั้งสิ้น 21 ต้น และต้นพริกที่เป็นต้นแฮพ พลอยด์ 23 ต้น อย่างไรก็ตามต้นพริกที่ได้มีความหลากหลายของลักษณะมากดังนั้นการนำต้นลูกผสม ที่ผ่านการคัดเลือกตามเกณฑ์มาแล้วอย่างน้อยชั่วหนึ่งมาทำการเพาะเลี้ยงอาจเป็นวิธีการที่จะเพิ่ม โอกาสให้ได้ต้นพริกสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะตามต้องการมากขึ้น

^{1/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย อ.แม่สรวย จ.เชียงราย 57180

^{2/} ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย 57000

ABSTRACT

Pepper double haploid lines are useful as breeding material for parental lines in hybrid development. Anther cultures of the pepper F₁ hybrid of sweet pepper x bell pepper were performed. Characteristics of pepper flowers with microspores at late-uninucleate stage of development with DAPI staining and then examined with a fluorescent microscope. The anthers were cultured on C medium supplemented with combination of 0.1 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l kinetin. The highest member of plantlets at 2.5 plantlets/100 anthers. Chloroplast count techniques from leaves of

regenerated plants was be used to determine the ploidy level. The results revealed that all 23 haploid plants were obtained. All of the diploid plants were spontaneous double haploid for the total number of 21 plants. However, the resulting pepper plants have a wide variety of characteristics. Therefore, cultivating a hybrid plant that has been selected for at least some time may be a way to increase the chances of a double haploid pepper with the desired characteristics.

บทนำ

การสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์เนื่องจากเป็นการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ (double haploid) ได้ภายในระยะเวลาสั้น พืชที่ได้ไม่มีการข้ามของยีน ประกอบด้วยพันธุ์กรรมรูปแบบต่างๆ ที่ไม่มีการกระจายตัวของลักษณะอีก (fixed recombination) ทำให้ช่วยลดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พริก ทั้งการคัดเลือกพันธุ์เพื่อนำไปใช้เป็นพ่อหรือแม่ในการผลิตลูกผสมหรือใช้เป็นประชากรในการศึกษาแผนที่โครโมโซม(พรพนซ์และจุลภาค, 2553)

ระเบียบวิธีการวิจัย

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. เมล็ดพันธุ์พริกกลุ่มผสมชั่วที่ 1 จำนวน 13 กลุ่ม
2. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารควบคุมการเจริญเติบโต
3. สารเคมี เช่น โคลชิซิน สี DAPI (4, 6-diamidino-2- phenylindole)

การวางแผนการทดลอง

ปลูกพริกกลุ่มผสมชั่วที่ 1 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร เพื่อให้ได้พริกหวานดับเบิลแฮพลอยด์ โดยได้จากสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous double haploid) หรือเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมต้นแฮพลอยด์ด้วยสารละลายโคลชิซิน

ขั้นตอนการดำเนินงาน

นำต้นพันธุ์พริกที่ได้จากการทดลองที่ 1 ผสมเพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1

1. ปลูกพริกหวานลูกผสมชั่วที่ 1 ในโรงเรือน จำนวนกลุ่มละ 10 ต้น ดูแลรักษาให้ปุ๋ยตามระยะการพัฒนานำให้ต้นพริกสมบูรณ์ เมื่อดอกพริกออกดอกต้องปลิดดอกบานหรือผลที่งอกอย่างสม่ำเสมอ
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะสัณฐานของดอกพริกกับระยะการพัฒนาดอกพริก นำดอกพริกดอกตูมในหลายๆ ขนาด หาระยะการพัฒนาดอกพริกโดยการย้อมสีไมโครสปอร์ด้วยการย้อมด้วยสี DAPI (4, 6-diamidino-2- phenylindole) แล้วตรวจสอบระยะการพัฒนาดอกพริกด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อหา ลักษณะของดอกพริกที่มีระยะของไมโครสปอร์ที่เหมาะสมคือระยะ late uninucleate
3. เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกกลุ่มผสมชั่วที่ 1 นำดอกพริกที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะ late uninucleate ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแยกอับละอองเกสรออกจากดอกแล้ววางบนอาหาร

สูตร C (Dumas de Vaulx *et al.*, 1981) ซึ่งมี 2,4-D ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคเนดิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (พรพนซ์, 2553) เพาะเลี้ยงในที่มีดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน (Dumas de Vaulx *et al.*, 1981) จากนั้น เพาะเลี้ยงที่มีด 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน แล้วย้ายอับละอองเกสรลงบนอาหารสูตร R (Dumas de Vaulx *et al.*, 1981) ที่มีโคเนดิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่มีแสงประมาณ 25-30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง เมื่อพบเอ็มบริโอเกิดขึ้นย้ายเอ็มบริโอลงบนอาหารสูตร R ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

4. เมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นพริกที่สมบูรณ์ ตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม (guard cell) ซึ่งต้นพริกที่ได้จากการเลี้ยงอับละอองเกสรนั้น อาจได้สายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous double haploid) และต้นแฮพลอยด์
5. เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมต้นพริกแฮพลอยด์ด้วยการเลี้ยงต้นพริกแฮพลอยด์ในอาหารที่มีสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนย้ายปลูก
6. ย้ายปลูกพริกหวานดับเบิลแฮพลอยด์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อเก็บเมล็ด แล้วปลูกคัดเลือกพันธุ์ต่อไป

- สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในปี พ.ศ. 2563 ได้ผสมพันธุ์พริกหวาน 7 พันธุ์ ได้แก่ California wonder Spider พันเตอร์ โพลาริส1838 เวก้า1288 พริกหวานจิวและ Giallo ผสมกับพริกหยวก พันธุ์ปากคลอง มณีกาญจน์ และ มณีไทย ได้เมล็ดพันธุ์คู่ผสมชั่วที่ 1 จำนวน 13 คู่ผสม ประกอบด้วย 1.) California wonderX ปากคลอง 2.) California wonder Xมณีกาญจน์ 3.) California wonderXมณีไทย 4.) พันเตอร์X ปากคลอง 5.) พันเตอร์Xมณีกาญจน์ 6.) พันเตอร์Xมณีไทย 7.) SpiderXปากคลอง 8.) SpiderX มณีไทย 9.) พริกหวานจิวXปากคลอง 10.) พริกหวานจิวXมณีกาญจน์ 11.) พริกหวานจิวXมณีไทย 12.) โพลาริส1838Xปากคลอง 13.) GialloXปากคลอง

ทำการสร้างพริกหวานสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ตามขั้นตอนในแผนผังดังภาพที่ 3 โดยศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะพื้นฐานของดอกพริกกับระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์แล้วนำดอกพริกที่มีไมโครสปอร์ในระยะที่เหมาะสมไปเพาะเลี้ยง เมื่อได้ต้นพริกจากการเพาะเลี้ยงทำการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซม ต้นพริกที่มีโครโมโซมชุดเดียวหรือต้นแฮพลอยด์ทำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซิน ต้นพริกที่มีโครโมโซมสองชุดหรือต้นดิพลอยด์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรนั้นอาจพบได้ โดยเกิดจากการพัฒนาของผนังอับละอองเกสรซึ่งมีพันธุกรรมเช่นเดียวกับต้นพริกที่ให้อับละอองเกสร หรืออาจเกิดการพัฒนาขึ้นจากเซลล์สืบพันธุ์ที่มีการเพิ่ม

จำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยง (spontaneous chromosome doubling) จะทำการตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์



ภาพที่ 3 แผนผังแสดงการสร้างพริกหวานสายพันธุ์ดัดเบิ้ลแฮพลอยด์

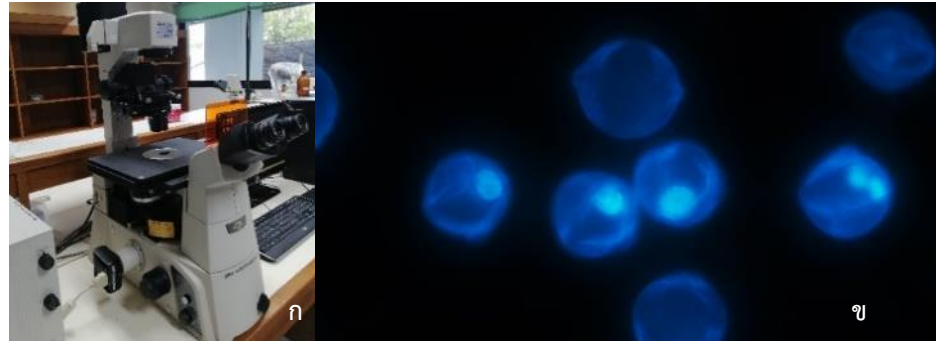
1. ศึกษาวิธีการในการสร้างพริกสายพันธุ์ดัดเบิ้ลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ในการสร้างสายพันธุ์ดัดเบิ้ลแฮพลอยด์ ประกอบด้วยหลาย ๆ ขั้นตอน ซึ่งวิธีการจากรายงานที่เคยศึกษามาก่อนนั้นอาจยังไม่เหมาะสมเนื่องจากพันธุกรรมของพริกหรือสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ดังนั้นในระหว่างการผสมพริกพ่อแม่พันธุ์เพื่อสร้างพริกลูกผสมชั่วที่ 1 จึงได้ศึกษาสถานะและวิธีการที่เหมาะสมในการสร้างพริกสายพันธุ์ดัดเบิ้ลแฮพลอยด์โดยใช้พริกหยวกพันธุ์ปากคลอง เพื่อจะได้ใช้วิธีการดังกล่าวในการสร้างพริกหวานสายพันธุ์ดัดเบิ้ลแฮพลอยด์ต่อไป

1.1 ศึกษาระยะเวลาพัฒนาของไมโครสปอร์

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะสัณฐานของดอกพริกกับระยะเวลาพัฒนาของไมโครสปอร์ โดยนำดอกพริกดอกตูมในหลาย ๆ ขนาด ทาระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์โดยการย้อมสีด้วย DAPI (4, 6-diamidino-2- phenylindole) แล้วตรวจสอบระยะเวลาพัฒนาของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อหาลักษณะของดอกพริกที่มีระยะของไมโครสปอร์ที่เหมาะสมคือระยะ late-uninucleate ซึ่งเป็นระยะที่แควิวโอลขยายขนาดใหญ่เกือบเต็มทั้งเซลล์ นิวเคลียสจะเคลื่อนจนกระทั่งติดกับผนังเซลล์และเตรียมแบ่งตัวแบบไมโทซิสครั้งที่ 1 ทำการบดอับละอองเกสรในสารละลาย DAPI ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคืบเศษอับละอองเกสรออก บ่มสไลด์ในที่มืด 10 นาทีแล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ณ ฝ่ายปฏิบัติการ งานกล้องจุลทรรศน์และเครื่องถ่ายภาพ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัย

แม่โจ้ (ภาพที่ 4) พบว่าไมโครสปอร์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสภายในติดสีเรืองแสงชัดเจน โดยไมโครสปอร์ที่อยู่ในระยะ late-uniucleate ตำแหน่งของนิวเคลียสจะติดกับผนังเซลล์ ส่วนไมโครสปอร์ที่ผ่านการแบ่งตัวแบบไมโทซิสครั้งที่ 1 แล้ว จะมี 2 นิวเคลียส หรือเรียกว่าระยะ binucleate

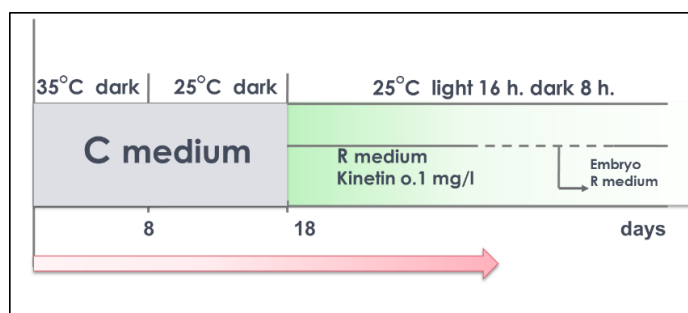


ภาพที่ 4 ก กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ณ ฝ่ายปฏิบัติการ งานกล้องจุลทรรศน์และเครื่องถ่ายภาพ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ข ไมโครสปอร์ระยะ late-uniucleate ของพริกกลุ่มผสมชั่วที่ 1 ย้อมสี DAPI ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 400 เท่า

1.2 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริก

จากรายงานของ Dumas de Vault และคณะ (1981) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกผลใหญ่หลายพันธุ์โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 5-40 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร โดยรายงานว่าการใช้อุณหภูมิสูงในการ pretreatment สามารถกระตุ้นการเกิดเอ็มบริโอได้ดี โดยเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หรือ 8 วัน พบว่าการใช้อุณหภูมิสูงเป็นเวลา 8 วัน ส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอได้ดีกว่า 2 วัน ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกตามวิธีของ Dumas de Vault *et al.*, 1981 แสดงดังภาพที่ 5 เมื่อฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วแยกอับละอองเกสรออกจากดอกแล้ววางบนอาหารสูตร C (Dumas de Vault *et al.*, 1981) ซึ่งมี 2,4-D ร่วมกับไคเนติน เพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน (Dumas de Vault *et al.*, 1981) จากนั้นเพาะเลี้ยงในที่มืด 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน แล้วย้ายอับละอองเกสรลงบนอาหารสูตร R (Dumas de Vault *et al.*, 1981) ที่มีไคเนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่มีแสงประมาณ 25-30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง เมื่อพบเอ็มบริโอเกิดขึ้นย้ายเอ็มบริอลงบนอาหารสูตร R ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นพริกที่สมบูรณ์

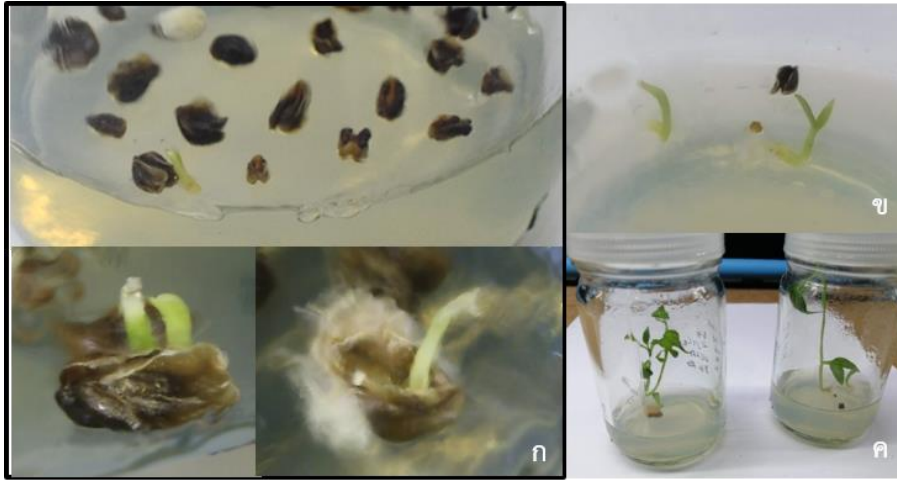


ภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกตามวิธีของ Dumas de Vault *et al.*, 1981

ได้ศึกษาภาวะในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริก โดยใช้พริกหยวกพันธุ์ปากคลอง เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในอาหารสูตร C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 หรือ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 4 6 หรือ 8 วัน ผลการศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหาร C ที่มี 2,4-D ทั้งสองระดับ ความเข้มข้น เป็นเวลา 8 วัน มีจำนวนต้นพริกที่เกิดขึ้นน้อยลง โดยเกิดต้นสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร C 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 6 วัน จำนวนต้น ต่อ 100 อับละอองเกสร สูงสุดเท่ากับ 5.8 (ตารางที่ 9) ดังนั้นจะใช้สูตรอาหารและสภาวะดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพริกหวานกับพริกหยวก

ตารางที่ 9 แสดงการพัฒนาเป็นต้นบนอาหารสูตร R จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกพันธุ์ปากคลองเมื่อชักนำให้ไมโครสปอร์พัฒนาเป็นเอ็มบริโอบนอาหารสูตร C ที่มีไคเนติน 0.1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 หรือ 0.3 มก./ล. โดยเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 4 6 และ 8 วัน

ทรีทเมนต์	จำนวน วัน	จำนวน อับละออง เกสร	จำนวน เอ็มบริโอที่ เกิดขึ้น	จำนวนต้น พริกที่ พัฒนา	จำนวนต้นต่อ จำนวนอับละออง เกสร 100 ชิ้น
2,4-D 0.1 มก./ล. + Kinetin 0.1 มก./ล.	4	207	32	7	3.4
2,4-D 0.1 มก./ล. + Kinetin 0.1 มก./ล.	6	226	34	13	5.8
2,4-D 0.1 มก./ล. + Kinetin 0.1 มก./ล.	8	216	13	4	1.9
2,4-D 0.3 มก./ล. + Kinetin 0.1 มก./ล.	4	214	22	11	5.1
2,4-D 0.3 มก./ล. + Kinetin 0.1 มก./ล.	6	207	11	3	1.4
2,4-D 0.3 มก./ล. + Kinetin 0.1 มก./ล.	8	200	10	2	1.0
		1,270	122	40	3.1



ภาพที่ 6 แสดงการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกหยวกพันธุ์ ‘ปากคลอง’

ก การเกิดเอ็มบริโอลักษณะเป็นเส้นสีขาวหรือสีเขียว หลังการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นเวลา 60 วัน

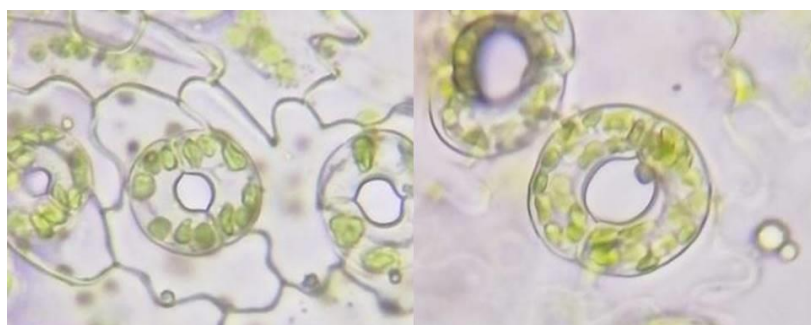
ข เอ็มบริโอพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร บนอาหาร R ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 10 วัน

ค ต้นพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร พริกหยวกพันธุ์ ‘ปากคลอง’

1.3 การตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซม

จากรายงานของ Arjunappa H.M. และคณะ (2015) ได้ศึกษาวิธีตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยศึกษา 3 วิธี คือ การนับจำนวนโครโมโซม การนับจำนวนคลอโรพลาสต์และการใช้เครื่องโพลไซโตมิเตอร์ ผลการทดลองพบว่าทุกวิธีสามารถใช้ตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมได้ การนับจำนวนโครโมโซมและการนับจำนวนคลอโรพลาสต์มีข้อดีกว่าการใช้โพลไซโตมิเตอร์คือมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า ข้อมูลจากการศึกษาการนับจำนวนชุดโครโมโซมและจำนวนคลอโรพลาสต์พบว่าแฮพลอยด์มีจำนวน โครโมโซม 12 แท่ง มีจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม (guard cell) 8-10 คลอโร พลาสต์ ต้นดิบบีลแฮพลอยด์มีโครโมโซม 24 แท่ง มีคลอโรพลาสต์ 16-20 คลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 7)

ได้นำต้นพริกจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกหยวกพันธุ์ปากคลอง ตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม พบว่าต้นพริกที่เป็นดิพลอยด์จำนวน 22 ต้น และแฮพลอยด์ 18 ต้น



ภาพที่ 7 แสดงจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม ก ต้นพริกแฮพลอยด์ ข ต้นพริกดิพลอยด์

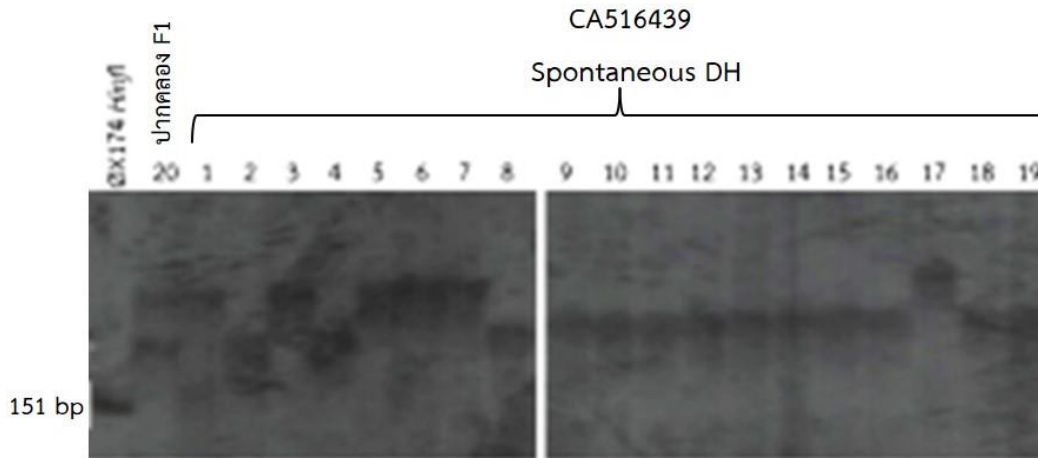
1.4 เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

จากรายงานของ Gemesne, J. A. และคณะ (2001) รายงานวิธีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมพริกแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยย้ายการตั้งพริกแฮพลอยด์ลงในอาหารสูตร R ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน แล้วย้ายปลูก พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมพริกแฮพลอยด์เป็นดับเบิลแฮพลอยด์ได้ 50-95 เปอร์เซ็นต์ จึงได้นำต้นพริกแฮพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกปากคลอง จำนวน 18 ต้น ดำเนินการตามวิธีการดังกล่าว เมื่อย้ายปลูกพบว่าต้นพริกบางส่วนตาย บางส่วนรอดชีวิตแต่เจริญเติบโตช้าอาจเกิดจากความเป็นพิษจากสารเคมี บางส่วนมีลักษณะต้นสมบูรณ์ แผ่นใบใหญ่ มีละอองเกสรมากซึ่งเป็นลักษณะของต้นดิพลอยด์ ส่วนต้นแฮพลอยด์จะมีใบเรียวยาว ปล้องถี่ ดอกเรียวยาวเล็ก

1.5 ตรวจสอบ spontaneous double haploid โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

ต้นพริกดิพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะต้องมีการตรวจสอบเซลล์ที่พัฒนาเป็นต้นพริกโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเนื่องจากต้นดิพลอยด์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรนี้อาจเกิดจากการพัฒนาของผนังอับละอองเกสรซึ่งมีพันธุกรรมเช่นเดียวกับต้นพริกที่ให้อับละอองเกสร หรืออาจเกิดการพัฒนาขึ้นจากเซลล์สืบพันธุ์ที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยง (spontaneous chromosome doubling) ส่งผลให้ต้นดิพลอยด์ที่เกิดขึ้นเป็นสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในงานปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นจึงต้องนำต้นดิพลอยด์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์สามารถแยกต้นดิพลอยด์ที่เกิดจากการพัฒนาของเซลล์ร่างกายของอับละอองเกสรหรือจากเอ็มบริโอพัฒนามาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยง (spontaneous chromosome doubling) ได้ โดยการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของต้น ดิพลอยด์ที่ได้กับแถบดีเอ็นเอของต้นที่ให้อับละอองเกสร โดยต้นดิพลอยด์ที่เกิดจากการพัฒนาจากเซลล์ร่างกายของอับละอองเกสรได้มาจากการรวมของเซลล์สืบพันธุ์ของแม่และพ่อ ดังนั้นควรมีแถบดีเอ็นเอของทั้งแม่และพ่อ ส่วนต้นพริกที่พัฒนาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยงนั้นจะมีแถบดีเอ็นเอเป็นแถบเดียวซึ่งอาจจะเป็นแถบใดเพียงแถบหนึ่งก็ได้ ดังนั้นได้นำต้นพริกส่งวิเคราะห์ต่อไป ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืช ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จากผลการตรวจสอบพบว่าแถบดีเอ็นเอของพริกพันธุ์ปากคลองซึ่งเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 (ตัวอย่างที่ 20) พบแถบดีเอ็นเอสองแถบ ตำแหน่งที่ 170 และ 160 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนต้นพริกที่พัฒนาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยงนั้นจะมีแถบดีเอ็นเอเป็นแถบเดียวซึ่งอาจจะเป็นแถบใดแถบหนึ่งก็ได้ จากการทดสอบต้นพริกดิพลอยด์จำนวน 19 ต้น (ตัวอย่างที่ 1 ถึง 19) ไม่พบต้นพริกที่พัฒนามาจากเซลล์ร่างกายของอับละอองเกสร แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงนี้สามารถจะชักนำการพัฒนาเอ็มบริโอจากละอองเกสรเท่านั้น



ภาพที่ 8 การตรวจสอบที่มาของเซลล์ที่พัฒนาเป็นต้นดิพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซเทลไลท์ CA516439

ตารางที่ 10 สรุปขั้นตอนและวิธีการสร้างพริกสารพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์

ขั้นตอน	วิธีการ
ศึกษาระยะเวลาการพัฒนาของไมโครสปอร์	ย้อมสีด้วย DAPI แล้วตรวจสอบระยะเวลาการพัฒนาของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์
เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรอาหารและสภาวะในเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร	อาหารสูตร C ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 0.1 มก./ล. ที่มีด 35 องศาเซลเซียส 6 วัน
ตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซม	การนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม (guard cell)
เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม	อาหารสูตร R ที่มีโคลชิซินความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน
ตรวจสอบ spontaneous double haploid โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซเทลไลท์

2. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกลูกผสมชั่วที่ 1

ทำการสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์จากพริก จำนวน 13 คู่ผสม ประกอบด้วย 1.) California wonderXปากคลอง 2.) California wonder Xมณีกาญจน์ 3.) California wonderXมณีไทย 4.) ทันเดอร์Xปากคลอง 5.) ทันเดอร์Xมณีกาญจน์ 6.) ทันเดอร์Xมณีไทย 7.) SpiderXปากคลอง 8.) SpiderXมณีไทย 9.) พริกหวานจิวXปากคลอง 10.) พริกหวานจิวXมณีกาญจน์ 11.) พริกหวานจิวXมณีไทย 12.) โพลาริส1838Xปากคลอง 13.) Gialloxปากคลอง

2.1 ศึกษาระยะเวลาการพัฒนาของไมโครสปอร์

ผลการศึกษาพบว่าลักษณะสัณฐานของดอกพริกที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะ late unnuceate ในพริกแต่ละคู่ผสมมีลักษณะแตกต่างกัน ดังภาพที่ 9 พริกลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพริกหวานจิวXปากคลอง ‘โพลาริส1838’X ‘ปากคลอง’ และ ‘Giallo’x‘ปากคลอง’ ลักษณะของดอกพริกจะมีกลีบดอกที่พันกลีบเลี้ยงขนาดใกล้เคียงกับขนาดของกลีบเลี้ยงและอับละอองเกสรมีสี

พริกลูกผสมแต่ละต้นมีพันธุกรรมแตกต่างกันการนำมาเพาะเลี้ยงจึงทำให้เกิดการตอบสนองเกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอ



ภาพที่ 10 ลักษณะการเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกหวาน

ก อับละอองเกสรที่เกิดแคลลัส

ข อับละอองเกสรที่เกิดราก

ค และ ง ลักษณะการเกิดเอ็มบริโอหลังเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกเป็นเวลา 40 วัน

ตารางที่ 11 แสดงการพัฒนาเป็นต้นบนอาหารสูตร R จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกลูกผสมชั่วที่ 1 เมื่อชักนำให้ไมโคร-สปอร์พัฒนาเป็นเอ็มบริโอบนอาหารสูตร C ที่มีไคนิติน 0.1 มก./ล.ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

คู่ผสมพริกที่เพาะเลี้ยงอับละอองเกสร	จำนวนอับละอองเกสร	จำนวนเอ็มบริโอที่เกิดขึ้น	จำนวนต้นพริกที่พัฒนา	จำนวนต้นต่อจำนวนอับละอองเกสร 100 ชิ้น
พริกหวานจีวXปากคลอง	1,154	14	3	0.26
พริกหวานจีวXมณีไทย	400	14	10	2.50
California wonderXปากคลอง	498	14	2	0.40
California wonderXมณีกาญจน์	140	3	1	0.71
California wonderXมณีไทย	454	14	9	1.98
ทันเดอร์Xปากคลอง	346	6	3	0.87
ทันเดอร์Xมณีไทย	470	21	10	2.13
โพลาริส1838Xปากคลอง	186	2	0	0.00
Gialloxปากคลอง	648	11	2	0.31
SpiderXปากคลอง	390	21	3	0.77
SpiderXมณีไทย	237	9	2	0.84
รวม	4,923	129	45	0.91

จากนั้นนำต้นพริกที่ได้ตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมได้ต้นพริกแฮพลอยด์ 23 ต้น พริกดิพลอยด์ 21 ต้น พริกในแต่ละคู่ผสมมีร้อยละการเกิด spontaneous double haploid แตกต่างกัน (ตารางที่ 12) นำต้นพริกดิพลอยด์ย้ายปลูกเพื่อเก็บเมล็ดพันธุ์ ภาพลักษณะผลพริกแสดง ดังภาพที่ 11

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมต้นพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละออง

เกสร				
คู่ผสมพริกที่เพาะเลี้ยงอับละออง เกสร	จำนวนต้นพริก ที่พัฒนา	แฮพลอยด์	ดิพลอยด์	ร้อยละ spontaneous double haploid
พริกหวานจีวXปากคลอง	3	1	2	66.7
พริกหวานจีวXมณีไทย	10	6	4	40.0
California wonderXปากคลอง	2	1	1	50.0
California wonderXมณีกาญจน์	1	1	0	0.0
California wonderXมณีไทย	9	5	4	44.4
ทันเดอร์Xปากคลอง	3	0	3	100.0
ทันเดอร์Xมณีไทย	10	4	5	50.0
โพลาริส1838Xปากคลอง	0	0	0	0
Gialloxปากคลอง	2	1	1	50.0
SpiderXปากคลอง	3	2	1	33.3
SpiderXมณีไทย	2	2	0	0.0
รวม	45	23	21	46.7



ภาพที่ 11 ลักษณะผลพริกที่ได้จากต้นพริกดิพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ก.จากคู่ผสมระหว่างพริกหวานจีวXมณีไทย ข. ทันเดอร์Xปากคลอง ค.พริกหวานจีวXปากคลอง

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

1. สรุปขั้นตอนและวิธีการสร้างพริกสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ ศึกษาระยะเวลาการพัฒนาของไมโครสปอร์ย้อมสีด้วย DAPI แล้วตรวจสอบระยะเวลาการพัฒนาของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรได้สูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมคือชักนำให้เกิดเอ็มโอในอาหารสูตร C ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 0.1 มก./ล. ที่มีด 35 องศาเซลเซียส 6 วัน เมื่อได้ต้นพริกจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม (guard cell) เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยใช้สารเคมีและตรวจสอบ spontaneous double haploid ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

2. การสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นวิธีการที่มีประโยชน์ต่อปรับปรุงพันธุ์เนื่องจากเป็นการลดระยะเวลาในการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ (double haploid) แต่อย่างไรก็ตามก็ต้องมีวิธีการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพเป็นอย่างมาก เพื่อให้ได้ต้นพริกมีจำนวนมากพอสำหรับคัดเลือกให้ได้ลักษณะตามต้องการ ดังนั้นการนำต้นลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกตามเกณฑ์มาแล้วอย่างน้อยชั่วหนึ่งมาทำการเพาะเลี้ยงก็อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้เพิ่มโอกาสได้ต้นพริกสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะตามต้องการมากขึ้น

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองการผสมและคัดเลือกพันธุ์พริกหวาน การสร้างประชากรสำหรับการคัดเลือก โดยผสมพันธุ์พริกหวานจำนวน 7 พันธุ์กับพริกหยวก 3 พันธุ์ ได้ลูกผสมจำนวน 13 คู่ผสม ในการปลูกคัดเลือก ได้พริกหวานที่สามารถเจริญเติบโต ให้ผลผลิตได้ดีในช่วงฤดูร้อนและมีลักษณะรูปทรงเหมือนพริกหวาน ได้จำนวน 3 คู่ผสมๆละ 5 สายต้น มาปลูกเพื่อทำการคัดเลือกในรุ่น F2 จำนวน 15 สายต้นๆละ 50 ต้น ได้ทั้งสิ้น 750 ต้น แยกเก็บเมล็ดแต่ละต้นเป็นสายพันธุ์ ในการปลูกคัดเลือกรุ่นที่ 3 ดำเนินการที่เชียงใหม่ ได้พริกหวานที่คัดเลือกไว้ 75 สายพันธุ์ เพื่อปลูกคัดเลือกในชั่วที่ 4 ต่อไป

2. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรได้สูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมคือชักนำให้เกิดเอ็มโอในอาหารสูตร C ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 0.1 มก./ล. ที่มีด 35 องศาเซลเซียส 6 วัน เมื่อได้ต้นพริกจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม (guard cell) เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยใช้สารเคมีและตรวจสอบ spontaneous double haploid ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

3. การสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นวิธีการที่มีประโยชน์ต่อปรับปรุงพันธุ์เนื่องจากเป็นการลดระยะเวลาในการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ (double haploid) แต่อย่างไรก็ตามก็ต้องมีวิธีการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพเป็นอย่างมาก เพื่อให้ได้ต้นพริกมีจำนวนมากพอสำหรับคัดเลือกให้ได้ลักษณะตามต้องการ ดังนั้น การนำต้นลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกตามเกณฑ์มาแล้วอย่างน้อยชั่วหนึ่งมาทำการเพาะเลี้ยงก็อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้เพิ่มโอกาสได้ต้นพริกสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะตามต้องการมากขึ้น

บรรณานุกรม

- สถานีวิทยุกระจายเสียงแห่งประเทศไทยจังหวัดพะเยา. (2560). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : www.thainews.prd.go.th. (วันที่ค้นข้อมูล : 18 เมษายน 2561).
- Arjunappa H.M, Sateesh Kumar. P, Prema Latha. D. 2015. Studies on Ploidy analysis and chromosome doubling in Androgenic plants of Chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) International Journal of Agriculture Innovations and Research Volume 4, Issue 4, ISSN (Online) 2319-1473
- Dumas de Vaulx, R., D. Chambonnet and E. Pochard. 1981. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents géotypes par des trgtitement à + 35°C. Agronomie 1: 859-864.
- Gemesne, J. A., M. Petus, G. Venczel, L. Zatyko, G. Gyulai and M. Cseplo, 2001. Genetic variability of anther donor versus spontaneous double haploid descendants and colchicine induced double haploid sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. Acta Horticulturae, 560: 149-152
- Verónica Parra-Vega Begon̄a Renau-Morata • Alicia Sifres • José M. Seguí-Simarro 2013 Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Cell Tiss Organ Cult () 112:353–360

ภาคผนวก



'California Wonder' x 'ปากคลอง'



'California Wonder' x 'มณีไทย'



'พันเดอร์' x 'ปากคลอง'



'พันเดอร์' x 'มณีกาญจน์'



'พันเดอร์' x 'มณีไทย'



'โพลาริส1838' x 'ปากคลอง'



'โพลาริส1838' x 'มณีไทย'



'Gala' x 'ปากคลอง'



'พริกหวานจีว' x 'ปากคลอง'



'พริกหวานจีว' x 'มณีกาญจน์'

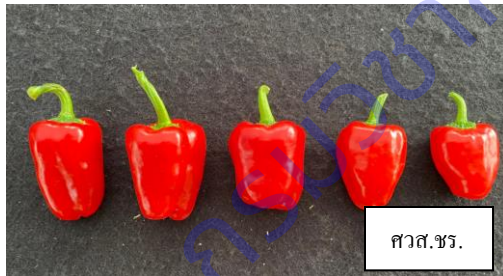


'พริกหวานจีว' x 'มณีไทย'

ภาพภาคผนวก ก พริกหวานชั่วที่ 1



ภาพภาคผนวก ข พริกหวานชั่วที่ 1 ระหว่าง พริกหวานจิ๋ว x ปากคลอง 191



ภาพภาคผนวก ค พริกหวานชั่วที่ 1 ระหว่าง พริกหวานจิ๋ว x มณีกาญจน์



ภาพภาคผนวก ง พริกหวานชั่วที่ 1 ระหว่าง พริกหวานจิ๋ว x มณีไทย



ภาพภาคผนวก จ พริกหวานลูกผสมชั่วที่ 2 ก. พริกหวานจิ๋ว x ปากคลอง191
ข. พริกหวานจิ๋ว x มณีกาญจน์ ค. พริกหวานจิ๋ว x มณีไทย