บทที่ 2

บททบทวนเอกสาร

ตอนที่ 1 การรวบรวมพันธุ์และการบันทึกลักษณะพริก

(Collection and description of peppers)

พริกเป็นพืชผักที่สามารถเจริญเติบโตได้ทั่วไปทั้งเขตร้อนและเขตอบอุ่น แต่มีการแพร่กระจายพันธุ์ได้มากในเขตร้อน พริกที่เพาะปลูกในประเทศไทยก็เช่นกันคือมีการเจริญเติบโต และแพร่กระจายพันธุ์ได้กว้างขวาง ปรากฏพริกลักษณะที่แตกต่างกันมากมายในแต่ละภาคของประเทศ การศึกษาและรวบรวมพริกต่าง ๆ เหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นต่องานทางด้านปรับปรุงพันธุ์พริกมาก จากรายงานของยุพา (2527) ได้รวบรวมพันธุ์พริกในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2525-2527 พบพริกมีชื่อพริกเมืองแตกต่างกันประมาณ 50 ชนิด และเก็บรักษาพันธุ์ไว้ที่ธนาคารยีนพืช (Germ bank) สภาวิจัยแห่งชาติ นอกจากนั้นแล้วพยนต์และคณะ (2526) ได้ศึกษาและรวบรวมพันธุ์พริกในประเทศไทยในช่วงระหว่างเดือนเมษายน-ธันวาคม 2521 นำมาปลูกศึกษาที่สถานีทดลองพืชไร่อู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี โดยรวบรวมมาจากแหล่งปลูก 708 แหล่ง และยังมีพริกบางส่วนถูกรวบรวมและปลูกไว้ที่โครงการพัฒนาพืชผักสู่ชนบท (Top/AVRDC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่หมวดพืชผัก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การรวบรวมพันธุ์พริกของต่างประเทศได้ทำกันมานานแล้ว ดังเช่นในประเทศสหรัฐอเมริกามีแหล่งรวบรวมพันธุ์พริกอยู่ที่ Southern region plant introduction station, Experiment, Georgia จำนวนมากกว่า 2,500 สายพันธุ์ โดยใช้รหัสเบอร์ภายใต้ชื่อสายพันธุ์ PI ต่าง ๆ และได้บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของพริกแต่ละเบอร์ไว้ นอกจากนั้นแล้วก็ยังมีการรวบรวมพันธุ์พริกไว้ที่ University of California ที่ Davis และ Riverside

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การรวบรวมพันธุ์พริกที่สำคัญมากได้แก่งานการรวบรวมพันธุ์พริกของ IBPGR (1983) ซึ่งกระจายหน่วยงานไปทั้งโลก มีแหล่งรวบรวมพันธุ์พริกที่ใหญ่อยู่ 25 แหล่ง คือ Brazil, Bulgaria, Costa Rica, Czechoslovakia, France, German Democratic Republic, Grcece, Hungary 2 แหล่ง, India 2 แหล่ง, Japan, Mexico, Netherlands, Nigeria, Peru, Philipines, Spain, Union of Soviet Republic, United Kingdom, United States of America 5 แหล่ง และมีแหล่งขนาดเล็กรองลงมาอีก 13 แหล่งคือ Australia, Austria, Bulgaria, Columbia, El Salvador, Ethiopia, Italy, Japan,. South Africa, Thailand, Tunisia, Turkey และ United Kingdom

การรวบรวมพันธุ์พริกในปัจจุบันทำให้เราทราบถึงแหล่งที่เก็บรักษาพันธุ์พริกที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ ได้มากมาย Pochard (1966) รายงานว่าพริกหยวกที่ดีควรมีผลโต ผิวมัน เนื้อแน่นและหนา ทนต่อสภาพการขนส่ง ต้านทานต่อโรคปลายผลเน่า พันธุ์ที่มีลักษณะดังกล่าวคือพันธุ์ California wonder Bartz and Stall (1974) รายงานว่าพริก C.chinense Accs. 1555, 1554, 906 (Uvilla Grande) มีความต้านทานต่อโรคผลเน่าและต้านทานต่อเชื้อ Erwinia carotovora ลักษณะการต้านทานควบคุมด้วยยีนเด่นซึ่งเป็นยีนหลัก 2-3 คัว และพบว่าพริกพันธุ์ Jalapeno มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุ E.carotovora สูงมาก Ullasa et al. (1981) รายงานถึงพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อโรคแอนแทรกโนสที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ Collectotrichum capsici ได้แก่พริก C. annuum พันธุ์ Chinese Giant, Yolo Y, Hungaria Yellow Wax, Spartan Emerald และ Paprika พันธุ์พริกที่ต้านทานต่อโรค cercospora leaf spot ได้แก่ พริกพันธุ์ California Wonder, Canape F_1, Merrimack Wonder และพริก C. microcarpum พริกพันธุ์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างที่เกิดจากเชื้อ Lereillula tanrica ได้แก่ C. microcarpum, C. pendulum และ C. pubescens แต่พวก C. annuum ที่ต้านทานต่อโรคนี้ได้บ้างกลางคือ World Beater, Flaorida 1063-2, Bull Nose, Midway, Spanish Long, PI 159252, PI 288982 และ Chilli Long ลักษณะการต้านทานเป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ ควบคุมด้วยยีน 3 คัว Cook (1963) รายงานว่าพริก C. chacoense พันธุ์ PI 260435 มียีนหลัก 1 คัวที่ต้านทานต่อโรคใบจุดที่เกิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากเชื้อสาเหตุ Xanthomonas campestris pv. vesicatoria race 1 และพริก C. annuum พันธุ์ PI 163129 ต้านทานต่อ race2 แต่พันธุ์ PI 163189, 163192, 271322 และ 322719 สามารถต้านทานได้ทั้งสอง races. Smith et al. (1967) รายงานว่าพริกสายพันธุ์ PI 188376, PI 201232 สามารถต้านทานต่อโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ Phytophthora capsici ได้ดี ลักษณะการต้านทานเป็นแบบข่มที่ควบคุมด้วยยีน 1-2 คู่ กฤษฎา (2531) รายงานว่าพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ Pseudomonas solanacearum ได้ มักจะเป็นพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับพันธุ์ป่า เช่น พันธุ์ Antibiosis, Chay3, Conic และ Cook และมักพบในพริก C. chinense และ C. frutescens มากกว่า C. annuum Holmes (1934 and 1937) รายงานว่าพริก C. frutescens สายพันธุ์ Tabasco และ C. annuum สายพันธุ์ Minimum blonco มีลักษณะการต้านทานโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ Tobacco mosaic virus เป็นแบบไร้ความต้านทานเชื้อ (Hypersensitivity) และลักษณะดังกล่าวควบคุมด้วยยีนข่มเพียง 1 คู่เท่านั้น และยังพบว่าพริกพันธุ์ Long Red Cayenne, Sunnybrook และสายพันธุ์ที่คัดได้จากพริกพันธุ์ Sweet Meat Glory มีลักษณะการต้านทานโรคโดยทำให้เกิดการเหลืองตามเส้นใบและใบจะหลุดร่วงไปในที่สุด ใบที่งอกออกมาใหม่จะปราศจากเชื้อไวรัส แต่อาการของโรคจะแพร่กระจายได้ดีที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) และพืชจะตายได้ในที่สุด

การบันทึกลักษณะประจำพันธุ์พริกเป็นสิ่งจำเป็นอันหนึ่งหลังจากที่รวบรวมพันธุ์พริกมาได้แล้ว การบันทึกลักษณะจะทำให้ทราบถึงลักษณะทั่วไปของพริกนั้น ๆ ตลอดจนถึงแหล่งที่มีการกระจายพันธุ์ของพริกและยังใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์หรือชนิดของพริกด้วย ลักษณะที่บันทึกไว้นั้นจะมีประโยชน์ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ (off type) ไปจากพันธุ์ดั้งเดิม และทำให้ทราบถึงลักษณะของพริกชนิดนั้นโดยที่ไม่ต้องปลูกใหม่อยู่ตลอดเวลา

การบันทึกลักษณะของพริกก็เช่นเดียวกันกับการบันทึกลักษณะของพืชชนิดอื่น ที่จะต้องมีการบันทึกลักษณะให้ละเอียดมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ พยนต์และคณะ (2526) ได้บันทึกลักษณะต่าง ๆ ของพริกดังนี้ จำนวนดอกต่อช่อ สีของกลีบดอก ตำแหน่งของเกสรตัวเมียการหลุดหรือไม่หลุดจากขั้วของผลสุก ตำแหน่งการวางตัวของผล สีของผลสุกและไม่สุก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเผ็ดของผล รูปลักษณะของผล ขนาดผล ความยาวก้านผล รูปร่างฐานของผล รูปลักษณะของกลีบดอก ชื่อที่กสิกรเรียก (local name) นอกจากนั้นแล้วยังมีแบบบันทึกลักษณะของพริกที่จัดทำขึ้นโดย IBPGR (1983) เป็นแบบบันทึกลักษณะที่ละเอียดมากแบ่งเป็นหัวข้อใหญ่ได้ 11 หัวข้อคือ ข้อมูลทั่วไป (Accession data) ข้อมูลเกี่ยวกับเวลาและสถานที่ (Collection data) ข้อมูลเกี่ยวกับอายุพันธุ์ (Site data) ข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญเติบโตทางลำต้นและผล (Plant data) ข้อมูลเกี่ยวกับพริกนั้นเมื่อนำไปปลูกยังแหล่งใหม่ (Further characterization and evaluation in site data) ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ (Plant data) การตอบรับต่อสภาวะแวดล้อม (Stress susceptibility) ความอ่อนแอต่อโรคและแมลง (Pest and disease susceptibility) ข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์ (Alloenzyme composition) ลักษณะทางเซลพันธุศาสตร์และการจำแนกยีน (Cytological characters and identified gene) และอื่น ๆ (Notes)

ตอนที่ 2 การจำแนกพริก (Classification of peppers)

พริกเป็นพืชที่เจริญเติบโตง่ายและขึ้นได้ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันได้มากมาย ประกอบกับมีการผสมข้ามได้ง่าย จึงทำให้พันธุ์พริกที่ใช้เพาะปลูกกันในปัจจุบันนี้มีลักษณะที่แตกต่างกันไปมากมาย แต่อย่างไรก็ดีเพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้ประโยชน์ จึงได้มีการตั้งกฎเกณฑ์ต่าง ๆ ขึ้นมาสำหรับใช้ในการจัดหมวดหมู่ของพริก

Erwin (1932) ได้จัดแบ่งกลุ่มพริกโดยอาศัยลักษณะของฐานกลีบเลี้ยง (Shape of calyx) เป็นเกณฑ์ในการจำแนกพริกออกเป็นกลุ่ม ๆ คือ Tabasco group, Cayenne group, Cherry group, Celestial group, Perfection group, Tomato group และ Bell group นอกจากนั้นแล้ว Smith and Heiser (1957) ได้จำแนกพริกออกเป็นหมวดหมู่ตามลักษณะความคล้ายคลึงกันของผัก ขนาด สีสรร เนื้อเยื่อกลิ่น ความเผ็ดและการนำไปใช้ประโยชน์ ได้ทั้งหมด 13 กลุ่มด้วยกันคือ Bell group, Pimento group, Squash or Cheese group, Ancho group, Anaheim chili group (Long green chile group), Cayenne group,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Cuban group, Jalapeno group, Small hot group, Cherry group, Short wax group, Long wax group และ Tabasco group. Paul et al. (1987) จัดแบ่งพริกออกเป็นกลุ่มโดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะขนาดผล สีผิว ความหนาของผนังผลและความเรียบ-ไม่เรียบของผล เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่มได้เป็น 1) กลุ่มที่มีผลใหญ่ ผิวเรียบและมีความหนาของผนังผลมากได้แก่พริก Bell group และ Pimento group 2) กลุ่มที่มีผลสั้น ผิวเรียบ ผนังผลบาง ได้แก่พริก Ancho group 3) กลุ่มที่มีผลเป็นกระเปาะยาวเรียว ได้แก่พริก Anacheim chilli group (Long green/Long red chile), Cayenne group, Cuban group 4) กลุ่มที่มีผลยาวประมาณ 7.5 เซนติเมตรและมีผิวสีเขียวเมื่อยังไม่แก่ ได้แก่พริก Jalapeno group, Serrano group, Small hot group 5) กลุ่มที่มีผลยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ผลอวบรูปกรวย ผนังผลหนา ได้แก่พริก Cherry group 6) กลุ่มที่มีผิวสีเหลืองเมื่อยังอ่อน ได้แก่พริก Small wax group, Long wax group 7) กลุ่มที่มีผลยาวเรียวประมาณ 2.5-2.75 เซนติเมตร ผิวสีเหลืองเมื่ออ่อนและเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อแก่มีความเผ็ดมาก ได้แก่พริก Tabasco group แต่อย่างไรก็ตามการจัดหมวดหมู่พริกแบบนี้ยังมีความคลาดเคลื่อนอยู่มาก ทั้งนี้เพราะพริกมีการผสมข้ามได้ง่าย ส่งผลให้มีการแปรปรวนของลักษณะอยู่ตลอดเวลา ในระยะเวลาต่อมาจึงได้หันมาใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบร่วมกับลักษณะทางเซลพันธุศาสตร์เป็นเกณฑ์ในการจำแนก สุรศักดิ์ (2530) ได้อ้างว่าเมื่อปี คศ.1837 Linnaeus ได้อธิบายว่าพริกมีเพียง 2 ชนิด (species) เท่านั้น คือ C. annuum L. และ C. frutescens L. และในปี คศ.1967 ระบุเพิ่มมาอีก 2 ชนิดคือ C. grossum L. และ C. baccatum L. แต่อย่างไรก็ดีการใช้หลักเกณฑ์ดังกล่าวนี้ก็ยังมีความคิดเห็นที่ขัดแย้งกันของบุคคลต่าง ๆ ดังเช่น Backer and Bakhuizen (1965) ได้จัดแบ่งพริกออกเป็น 5 ชนิดคือ C. violaceum H.B.K., C. frutescens, C. baccatum C. annuum และ C. grossum Epenhuijise (1974) แบ่งพริกออกเป็น 2 ชนิดคือ C. annuum และ C. frutescens Chote (1978) ก็มีความคิดเห็นตรงกับ Epenhuijisen และจากการจำแนกของกฤษฎา (2531) ได้จัดแบ่งพริกออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ๆ ด้วยกันคือ C. annuum, C. frutescens, C. Chinense Jacquin, C. pendulum Willdenow และ C. pubescens Ruiz and Pavon. Eshbaugh (1970) เสนอแนะว่า C.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

pendulum และ C. microcarpum Cavanilles มีลักษณะใกล้เคียงกันน่าจะจัดเป็นพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์ของ C. baccatum แทน

แต่อย่างไรก็ตามจากการประชุมของกลุ่มทำงานทางพืช Capsicum ณ กรุงวาเกนนิงเกน ประเทศเนเธอร์แลนด์ในปี คศ. 1983 Eshbaugh et al. ได้เสนอว่าพริกที่พบในปัจจุบันนี้ มีอยู่ด้วยกัน 27 ชนิด (Species) คือ C. buforum A.T. Hunz, C. campylopodium Sendt, C. ciliatum (H.B.K.) O.K., C. cornutum (Hiern) A.T. Hunz., C. dimorphum (Miers) O.K., C. dusenii Bitter, C. flexuosum Sendt, C. geminiforium (Dammer) A.T. Hunz, C. hookerianum (Miers) O.K., C. lanceolatum (Green) Morton & Standley, C. mirable Mart. ex Sendt., C. parvifolium Sendt, C. schottianum Sendt., C. scolnikianum A.T. Hunz., C. villosum Sendt., C. cardenasii Heiser & Smith, C. eximium A.T. Hunz., C. pubescens R&P, C. tovari nom. nud., C. annuum, C. baccatum, C. chacoense A.T. Hunz., C. Chinense, C. coccineum (Rusby) A.T. Hunz., C. frutescens, C. galapagoense A.T. Hunz., C. praetermissum Heiser & Smith แต่มีพริกเพียง 5 ชนิดเท่านั้นที่ใช้เพาะปลูกกันโดยทั่วไป คือ C. annuum C. frutescens, C. chinense, C. baccatum และ C. pubescens

ตอนที่ 3 การผสมข้ามพันธุ์ (Intervarietal hybridization)

โดยธรรมชาติแล้วพริกเป็นพืชที่มีอัตราการผสมตัวเองค่อนข้างสูงมาก เพราะสภาพโครงสร้างของดอกที่ค่อลงในระยะที่มีการผสมเกสร ประกอบกับมีระยะชีคของอับเกสรตัวผู้ (anther) และเกสรตัวเมีย (Stigma) มาก จึงทำให้พริกมีอัตราการผสมตัวเองสูงกว่าอัตราการผสมข้าม แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถกำหนดลงไปได้แน่นอนว่าพริกมีอัตราการผสมตัวเองเป็นเท่าใด ทั้งนี้เพราะอัตราการผสมตัวเองขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ คังรายงานของสมศักดิ์ (2530) ที่อ้างถึงงานทดลองของ Odland and Porter ปี คศ.1941 ที่ทำการทดลองในพริก 6 พันธุ์ พบว่ามีอัตราการผสมตัวเองตั้งแต่ร้อยละ 68

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถึง 91 ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของพริก และเช่นเดียวกันได้อ้างถึงรายงานของ Murthy and Murthy (1962) ในเรื่องความพร้อมในการผสมพันธุ์ของเกสรตัวผู้และตัวเมีย กล่าวคือ เกสรตัวผู้พร้อมที่จะผสมได้ก็ต่อเมื่อดอกบานไปได้แล้ว 2-3 วัน แต่เกสรตัวเมียพร้อมที่จะผสมเกสรได้ทันทีเมื่อดอกบาน นอกจากนั้นแล้วการปลูกพริกในระยะชิดเกินไปหรือการปลูกพริกในพื้นที่ที่มีแมลงช่วยผสมเกสรมาก ก็เป็นผลให้อัตราการผสมตัวเองของพริกลดต่ำลงได้เช่นกัน

อย่างไรก็ตามถึงแม้จะจัดได้ว่าพริกเป็นพืชที่มีอัตราการผสมตัวเองค่อนข้างสูง แต่ในสภาพธรรมชาตินั้นก็ยังมีการผสมข้ามเกิดขึ้นได้มาก โดยเฉพาะการผสมข้ามพันธุ์ซึ่งเกิดขึ้นได้ง่ายมาก ดังรายงานของ Hawthorn and Pollard (1954) รายงานว่าในสภาพที่ต้นพริกปลูกชิดกันมาก อาจมีอัตราการผสมข้ามได้สูงถึงร้อยละ 9-32 ขึ้นอยู่กับพันธุ์ และบอกว่าระยะปลูกพริกสำหรับเก็บเมล็ดพันธุ์ควรใช้ระยะห่างระหว่างพันธุ์ (isolation) ไม่ต่ำกว่า 1/4 ไมล์ Steven (1984) รายงานว่าจากการทดลอง 2 ปีกับพันธุ์พริกที่เพาะปลูกเป็นการค้า 5 สายพันธุ์ทางตอนใต้ของ New Mexico พบว่ามีอัตราการผสมข้ามเฉลี่ยร้อยละ 42 และบางต้นมีอัตราการผสมข้ามสูงถึงร้อยละ 91 Odland and Porter (1941) รายงานว่าการผสมข้ามตามธรรมชาติส่วนมากเกิดขึ้นเนื่องจากผึ้งการผสมข้ามอาจเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ร้อยละ 7.6-36.8 มีค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 76.5 และมีวิธีทดสอบอัตราการผสมข้ามได้โดยการปลูกพริกเหล่านั้นสลับกับพันธุ์ที่มีลักษณะเด่น เช่นพันธุ์ Harris Early Giant ปรากฏว่าพริกแต่ละพันธุ์มีอัตราการผสมข้ามไม่เท่ากัน ซึ่งสังเกตุได้จากลักษณะบางประการของดอกพริกในรุ่นต่อมาได้ว่ามีความใกล้ชิดของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียต่างกัน พริกมีระยะปลอดจากแมลงและละอองเกสรพันธุ์อื่น อยู่ในช่วงประมาณ 600 ฟุตหรือ 180 เมตร

การผสมข้ามพันธุ์เกิดขึ้นได้เสมอทั้งในสภาพธรรมชาติเอง และเกิดจากการช่วยผสมข้ามโดยมนุษย์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ Erwin (1932) ได้เก็บเมล็ดพันธุ์จากแปลงผสมเปิดของพริก Perfection มาปลูก พบว่าในจำนวน 10 ต้นจะมีต้นที่เหมือนต้นแม่เดิมเพียง 3 ต้น ที่เหลือมีลักษณะเป็นแบบ Bull Nose (C. grossum) 2 ต้น และอีก 5 ต้นมีลักษณะเป็นแบบ Cayenne (C. acuminatum) และเช่นเดียวกันที่ Erwin ได้นำเมล็ดพริกจากแปลงผสมเปิดของพันธุ์พริกแบบ Tomato (C. grossum) มาปลูก พบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ว่าพริกที่ปลูกในรุ่นต่อมาจำนวน 15 ต้น มี 2 ต้นที่มีลักษณะเป็นแบบ Perfection 6 ต้น Bull Nose 2 ต้นและอีก 5 ต้นมีลักษณะเหมือนต้นแม่ การผสมข้ามตามธรรมชาติเหล่านี้ทำให้ได้พริกพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นมาอยู่ตลอดเวลา แต่อย่างไรก็ตามการผสมข้ามตามธรรมชาติเกิดขึ้นได้ไม่บ่อยครั้ง และลักษณะที่เกิดขึ้นมักไม่ตรงกับความต้องการของผู้ปลูก จึงได้มีการช่วยให้มีการผสมข้ามโดย มนุษย์ เพื่อให้ได้ลักษณะของพริกพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตรงตามความต้องการของผู้ปลูกและผู้บริโภค ปัจจุบันนี้งานด้านการผสมข้ามพันธุ์พริกมีความจำเป็นมากต่อการสร้างพันธุ์พริกใหม่ทั้งที่เป็นสายพันธุ์ผสมเปิด (open pollinated variety) และพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid variety) Nakayama (1985) ได้ผสมพันธุ์พริก Rio Grande, Native type, Bulgarian Paprika และ New Mexico 6-4 เข้าด้วยกัน และทำการคัดเลือกจนกระทั่งได้พันธุ์พริก Numex R.Naky ซึ่งเป็นพริกที่มีรสเผ็ดผลยาว ผิวเรียบ ขนาดผล 4.4x17.5 เซนติเมตร ผลสีแดงเมื่อแก่สุก เหมาะแก่การผลิตเป็นพริกแห้ง Shigeni and Price (1986) ได้ผสมพันธุ์พริก Avelar เข้ากับสายพันธุ์ที่ได้มาจากการผสมของพริก Romanian,Kupos, Umajoiri ทำการคัดเลือกจนได้พริกพันธุ์ Migold ซึ่งเป็นพริกมีลักษณะผลแบบ Bell มีขนาดทรงพุ่ม 45x55 เซนติเมตร มีกิ่งก้านแข็งแรงแต่แตกกิ่งน้อย ผลมีสีเหลืองขนาด 6-7x10-13 เซนติเมตร ความหนาของเปลือก 6 มิลลิเมตร การเก็บเกี่ยวผลต้องทำหลายครั้ง Benigno (1986) ได้ผสมพริกพันธุ์ Agronomico 8 กับพริกพันธุ์ Grade Rio 66 เข้าด้วยกันและคัดเลือกพันธุ์จนถึงชั่วที่ 3 จึงทำการผสมกลับไปหาพันธุ์ Grade Rio 66 คัดเลือกต่อจนถึงชั่วที่ 7 จึงนำไปผสมกับพริกพันธุ์ Keystone Resistant Giant #3 แล้วทำการคัดเลือกจนถึงชั่วที่ 8 ก็ได้พริกพันธุ์ Tambel-2 ซึ่งเป็นพริกที่มีรูปผลเป็นแบบ Bell มีลำต้นแข็งแรง มีการแก่ของผลพร้อมกัน มีช่องผล 3-4 ช่อง มีกลิ่นหอม ผิวสีเขียวเข้ม เปลือกหนา 5-6 มิลลิเมตร ขนาดผล 10x9 เซนติเมตร และเช่นเดียวกัน Benigno ได้ผสมพริก PI 342947 ซึ่งมีความต้านทานโรคที่มีสาเหตุมาจากไวรัสได้ดี เข้ากับพริกพันธุ์ Avelar ซึ่งเป็นพริกที่มีทรงผลเป็นแบบ Bell ทำการคัดเลือกในชั่วต่อมาจนถึงชั่วที่ 3 จึงทำการผสมกลับไปหาพริกพันธุ์ PI 342947 อีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงคัดเลือกลูกที่ได้ออกมาเป็นพริกพันธุ์ Hidalgo มีขนาดของทรงพุ่มเบ็น 50x60 เซนติเมตร มีลำต้นที่แข็งแรง มีการแก่ของผลที่ใกล้เคียงกันเหมาะสำหรับการเก็บเกี่ยวที่ใช้เครื่องจักรช่วยในการเก็บเกี่ยว นอกจากนั้นแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กฤษฎา (2531) ยังได้รายงานถึงพันธุ์พริกมากมายที่ใช้ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน ที่ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ของพริกที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยมีจุดประสงค์ของการผสมข้ามพันธุ์เพื่อให้ได้พริกพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามที่ต้องการ สายพันธุ์หรือพันธุ์ใหม่ที่ได้มานี้จะอยู่ในลักษณะของพันธุ์ผสมเปิด (open pollinated variety)

นอกจากการผสมพันธุ์ดังกล่าวนี้แล้ว การผสมข้ามพันธุ์ ก็ยังมีจุดประสงค์เพื่อการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid variety) เพื่อเป็นการนำสายพันธุ์พริกที่ได้มาใช้ในทางการค้า Bruinsma and Pochard (1975) ได้สร้างลูกผสมชั่วที่ 1 ของพริกโดยการผสมระหว่างพริกพันธุ์ CW (ms/ms) x Sweet Westland และได้พริกพันธุ์ Bruinsma Wonder ออกมา Pochard (1982) รายงานว่ามีการผลิตพริกลูกผสมชั่วที่ 1 ในประเทศบูลกาเรีย ฝรั่งเศสและยูโกสลาเวียมากมาย โดยใช้ลักษณะการเป็นหมันของยีนในนิวเคลียสช่วยให้เกิดการผสมข้าม ดังเช่นพันธุ์พริกลูกผสม Lamuyo INRA

การผสมข้ามพันธุ์พริกยังใช้ประโยชน์ในการศึกษาถึงการถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ (Inheritance) ของพริกได้ด้วย Khambanonda (1950) รายงานถึงการถ่ายทอดลักษณะและรูปร่างของผลพริกว่า ผลที่มีขนาดเล็กและกลมจะเป็นลักษณะข่มต่อผลที่มีขนาดใหญ่และยาว การกระจายตัวของพริกในชั่วที่ 2 จะให้อัตราส่วนออกมาเป็น 3:1 Ohta (1962) พบว่าระดับความเผ็ดของผลพริกถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก โดยมียีนหลักเป็นตัวกำหนดความเผ็ดส่วนยีนย่อยต่าง ๆ เป็นตัวทำให้ระดับความเผ็ดผันแปรไปในทางบวกและลบ ความเผ็ดของลูกในชั่วที่ 2 จึงมีการกระจายตัวอย่างต่อเนื่อง Smith (1950) ศึกษาถึงลักษณะการเกิดสีแดง สีน้ำตาล สีเหลืองและสีเขียวของผลพริกเมื่อแก่จัด พบว่าลักษณะดังกล่าวถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 2 คู่ทำให้อัตราการกระจายตัวของสีผลในชั่วที่ 2 เป็น 9:3:3:1 การศึกษานี้มีประโยชน์ในการนำลักษณะสีเขียวในผลแก่มาใช้ในการยืดเวลาการเก็บเกี่ยวพริกหยวก เนื่องจากพริกหยวกสีแดงไม่เป็นที่นิยมในการบริโภคสด Odland and Porter (1938) ศึกษาการควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมของสีในผลอ่อน พบว่าการควบคุมสีเหลือง สีเขียวอมเหลืองและเขียวเข้ม ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 2 คู่เช่นกัน Subramanya (1983) ศึกษาลักษณะการออกผลเป็นช่อในพริก C. chinense พบว่ามียีนข่มอยู่ประมาณ 3 ตัวที่ควบคุมลักษณะการออกดอกเป็นคู่ และมียีนมากกว่า 3 ตัวที่ควบคุมให้ช่อดอกแต่ละช่อมีดอก 3-4 ดอก การใช้วิธีการผสมกลับสลับกันการผสมตัวเอง

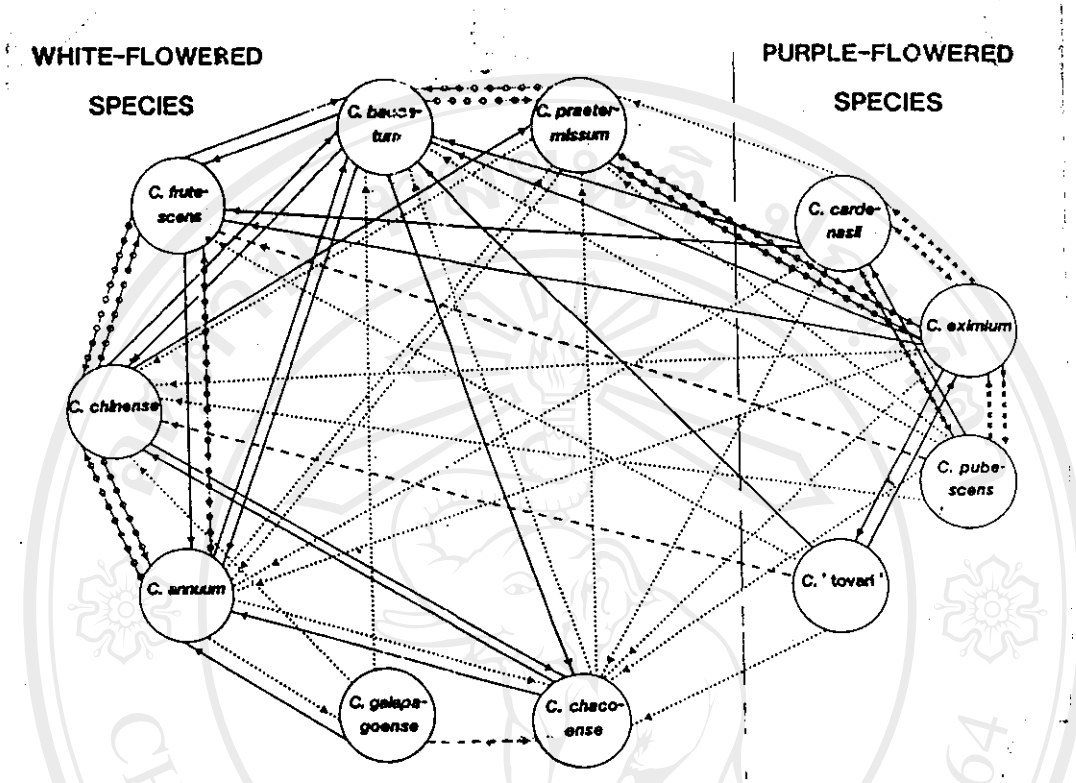
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะช่วยถ่ายทอดยีนพวกนี้เข้าสู่ C. annuum ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การผสมพันธุ์พริกเพื่อให้ได้พริกพันธุ์ใหม่ที่มีความต้านทานต่อโรคสูงก็เป็นประโยชน์อย่างหนึ่งของการผสมข้ามพันธุ์ Kimble and Grogam (1960) ได้ผสมข้ามพันธุ์พริก เพื่อให้ได้พริกพันธุ์ใหม่สามารถต้านทานต่อโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ Phytophthora capsici ระหว่างพริกพันธุ์ต้านทานโรค PI 201234 และเป็นลักษณะร่วมกับพริกพันธุ์อื่นที่ไม่ต้านทานโรค พบว่าการกระจายตัวในชั่วที่ 2 และ 3 ได้อัตราส่วนของต้นที่ต้านทาน:ไม่ต้านทานเป็น 3:1 หรือ 15:1 แสดงว่าเป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยยีน 1 หรือ 2 ตัว Cook (1963) ได้ศึกษาลักษณะการต้านทานต่อไวรัสพวก potyviruses ในพริก Cayenne พบว่าเป็นพวก multiple alleles

ตอนที่ 4 การผสมข้ามชนิด (Interspecific hybridization)

พริกที่เพาะปลูกกันโดยทั่วไปมักจะเป็นพริกชนิด C. annuum ส่วนพริกชนิดอื่นจะมีการปลูกกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ได้แก่ C. chinense, C. frutescens, C. baccatum และ C. pubescens พริกแต่ละชนิดก็มีคุณสมบัติที่ดีแตกต่างกันไป สภาพแวดล้อมที่ต้องการในการเจริญเติบโตของพริกแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกันบ้าง การเพาะปลูกพริกโดยทั่วไปจึงไม่นิยมปลูกพริกหลาย ๆ ชนิดในพื้นที่เดียวกัน ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้จึงเป็นสาเหตุให้การผสมข้ามระหว่างชนิดเกิดขึ้นได้น้อยกว่าการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ พริกพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างชนิดจึงมีน้อยมาก ประกอบกับการผสมข้ามชนิดมักจะพบกับอุปสรรคความเข้ากันไม่ได้ (incompatibility) ทำให้ไม่สามารถสร้างเมล็ดสร้างผลได้หลังการผสม หรือสามารถสร้างเมล็ดขึ้นมาได้แต่เมล็ดเป็นหมัน หรือเกิดอาการผิดปกติขึ้นในเมล็ดหรือต้นกล้าในชั่วที่ 2 สาเหตุดังกล่าวส่งผลให้ไม่สามารถแพร่พันธุ์ต่อไปได้ จึงไม่พบพริกพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดได้มากนัก Pickersgill (1980) ศึกษาถึงการผสมข้ามระหว่างชนิดของพริกชนิดต่าง ๆ พบถึงความเป็นไปได้และเป็นไปไม่ได้ของการผสมข้ามชนิดในรูปแบบต่าง ๆ ดังแสดงในแผนภาพดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 1 ความเป็นไปได้ หรือเป็นไปไม่ได้ของการผสมข้ามชนิดพริก

———— ลูกผสมชั่วที่ 1 งอกได้ตามปกติ

(F1 hybrids germinate normally)

------ ลูกผสมชั่วที่ 1 งอกได้โดยอาศัยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วย

(F1 hybrids raised by embryo culture)

..... สร้างผลหรือเมล็ดได้ แต่เมล็ดไม่งอก

(Fruits and/or seeds set but F1 seeds inviable)

oooooo ลูกผสมชั่วที่ 1 งอกได้บางส่วน

(F1 hybrid partially fertile)

xxxxxx ลูกผสมชั่วที่ 1 งอกได้ดีมาก

(F1 hybrid highly fertile)

◄ แนวที่ชี้ไปหาต้นแม่

(points in direction of female parent)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Egawa and Tanaka (1986) ศึกษาลักษณะทางเซลพันธุศาสตร์ของลูกผสมพริกที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างชนิดของ C. annuum และ C. baccatum ในระยะ metaphase 1 เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อและแม่พบว่ามีความแตกต่างของโครโมโซมอย่างน้อย 3 แห่ง และถึงแม้จะได้รับการถ่ายทอดลักษณะมาจากทางพ่อและแม่ แต่ก็เกิดการผันแปรของโครงสร้างของโครโมโซมได้ Marinkovic et al. (1984) ศึกษาการผสมข้ามระหว่างชนิดของพริก C. frutescens เบอร์ 606 กับพริก C. annuum เบอร์ 674 เพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ Verticillium albo-atrum พบว่าการใช้พริกเบอร์ 674 เป็นต้นพ่อในการผสม จะได้พันธุ์พริกที่มีความต้านทานต่อโรคได้ดีกว่าการใช้พริกเบอร์ 606 เป็นต้นพ่อ Miladinovic et al. (1985) ศึกษาการถ่ายทอดยีนต้านทานโรค cucumber mosaic virus โดยผสมข้ามชนิดระหว่างพริก C. annuum, C. chinense และ C. pendulum พบว่าหลังจากมีการผสมกลับ 4 ครั้ง และผสมตัวเองอีก 5 ครั้ง ก็สามารถคัดเลือกพริกพันธุ์ใหม่ที่มียีนต้านทานต่อโรคนี้ได้ Pundeva and Zagorska (1984) ศึกษาถึงการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อช่วยในการผสมข้ามชนิดของพริก C. annuum x C. praetermissum และ C. annuum x C. eximium พบว่าการใช้อาหารสูตร Murashige and Skoog ที่เพิ่ม ferulic acid 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะใช้เพาะเลี้ยงรากของต้นอ่อนได้ดี สมพรและสายันห์ (2518) ศึกษาถึงการผสมข้ามระหว่างชนิดของพริก C. annuum และ C. frutescens พบว่าเมื่อใช้ C. annuum เป็นต้นแม่จะไม่มีการสร้างผลได้ แต่ไม่มีการสร้างเมล็ด

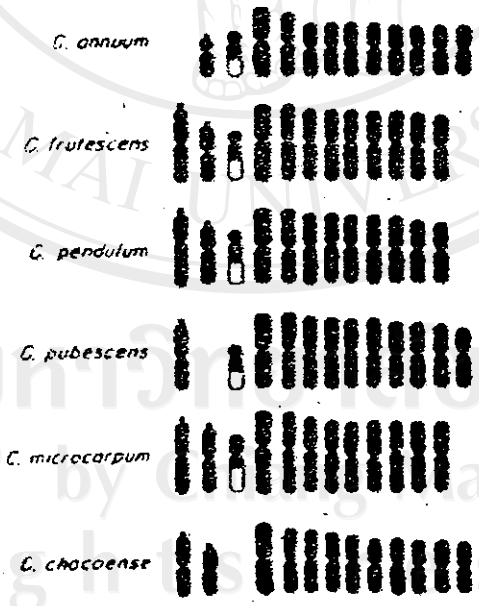
พริกลูกผสมข้ามชนิดของพริก Tabasco ซึ่งเป็นพริก C. frutescens ผสมกับ C. pendulum เป็นตัวอย่างของพริกลูกผสมที่มีความเป็นหมันสูงคือมีละอองเกสรตัวผู้ปกติเพียง 3% แต่ถ้าดูจากการแบ่งตัวของเซลในระยะ meiosis จะไม่พบความผิดปกติ แต่ในคู่ผสมระหว่าง C. chinense x C. annuum จะมีลักษณะการเชื่อมติดกันของโครโมโซมในระยะ meiosis II เกิดขึ้นบ้าง ทำให้โครโมโซมดังกล่าวไม่สามารถเคลื่อนตัวไปหาขั้วของเซลได้ ทำให้เกิด micronuclei ขึ้น การเป็นหมันของลูกผสมจึงเกิดขึ้นจากการไม่สมดุลย์ของทั้งโครโมโซมและยีน แต่การไม่สมดุลย์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากความไม่สมดุลย์ของยีนในเซลสืบพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนั้นแล้วมีการใช้การผสมข้ามชนิดเพื่อทำการปรับปรุงลักษณะของพริกที่มีอยู่ให้ดีขึ้นกว่าเดิม ดังเช่น Steven and Jaime (1984) ได้ผสมข้ามระหว่างชนิดของพริก C. annuum MN 6-4 กับ C. chinense CA-4 ทำให้จำนวนดอกต่อช่อของพริกพันธุ์ใหม่เพิ่มขึ้นเป็น 1.5 ดอกต่อช่อ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 50%

แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีอุปสรรคในการผสมข้ามชนิดอยู่บ้าง ก็มีการพยายามหาทางแก้ไขเพื่อให้การผสมข้ามเกิดขึ้นได้ Dumas and Pitral (1977) ได้หาวิธีการผสมข้ามชนิดระหว่างพริก C. annuum และ C. baccatum var pendulum โดยการผสม 2 ครั้ง ครั้งแรกใช้ละอองเกสรจาก C. annuum หลังจากการผสมครั้งแรก 3-4 วันจะได้เมล็ดเฉลี่ย 2-3 เมล็ดต่อผล หรืออาจใช้วิธีการอบเกสรตัวเมียด้วยแก๊สไนตรัสออกไซด์ (N_2O) ภายใต้ความดัน 6 เท่าของบรรยากาศปกติเป็นเวลา 4 ชั่วโมงก่อนที่จะมีการผสมเกสรหลังจากนั้นผสมด้วยละอองเกสรจาก C. baccatum จะได้เมล็ดเฉลี่ย 7 เมล็ดต่อผล

Ohta (1962) ได้เสนอแผนภูมิของโครโมโซมของพริกหกชนิดดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แผนภูมิของโครโมโซม (Karyotypes) พริกชนิดต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะเห็นได้ว่าพริก C. frutescens, C. pendulum และ C. microcarpum มีลักษณะของโครโมโซมที่คล้ายคลึงกัน มีเพียง 3 แห่งเท่านั้นที่มีรูปร่างแตกต่างจากแห่งอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด แห่งที่หนึ่งมี satellite ขนาดใหญ่ แห่งที่สองมี Satellite ขนาดเล็กกว่า แห่งที่สามมี centromere ค่อนไปทางปลายด้านหนึ่ง และปลายอีกข้างหนึ่งมีส่วนของ heterochromatic region ส่วนโครโมโซมอีกเก้าแห่งที่เหลือ มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยมี centromeres อยู่ตรงกลางแห่งโครโมโซม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพริกชนิดใด ๆ ก็ตามที่มีลักษณะของโครโมโซมคล้ายคลึงกันจะสามารถผสมข้ามกันได้ดีขึ้น

ตอนที่ 5 อิเลคโตรโฟรีซีส (Electrophoresis)

อิเลคโตรโฟรีซีสเป็นวิธีการหนึ่งทางชีวเคมีที่อาศัยคุณสมบัติของสารประกอบที่มีอยู่ในพืชมาเป็นเกณฑ์ในการจัดหมวดหมู่ของพืช วิธีการทางชีวเคมีเหล่านี้มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ดังเช่น thin layer chramatography, gas chromatography, serological techniques, color and spot test แต่อย่างไรก็ตามวิธีการอิเลคโตรโฟรีซีสเป็นที่นิยมและยอมรับกันมากกว่าวิธีอื่น ๆ

เพิ่มพงษ์ (2530) รายงานว่า การใช้เทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีสในการแยกและวิเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ซึ่งเป็น primary และ secondary product จากการแสดงกิจกรรมของยีน จะมีความคงตัวของรูปแบบเสมอจนกว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้นที่ nucleotide sequence of gene หรือ coding base sequence จึงจะไปมีผลต่อการสร้างโปรตีน (polypeptide) ให้มีโครงสร้างทางโมเลกุลของกรดอมิโนที่เรียงลำดับแตกต่างกัน และส่งผลไปถึงการมีประจุไฟฟ้ารวม ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลที่ไม่เหมือนกัน เมื่อถูกนำมาแยกในตัวกลางที่เหมาะสมตามวิธีการอิเลคโตรโฟรีซีสก็ทำให้โมเลกุลเหล่านั้นเคลื่อนที่ในอัตราต่างกัน เมื่อถูกนำมาย้อมสีก็จะเกิดแถบสีของโปรตีนที่เรียกว่า Zymogram เป็นลักษณะเฉพาะของพืชนั้น ๆ และสามารถนำไปจำแนกความแตกต่างระหว่างพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการอิเลคโตรโฟรีซีสที่ดีขึ้นอยู่กับปัจจัย 4 ประการคือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1) protein or isozyme pattern ที่ได้ต้องมาจากพืชทดสอบที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน

2) ต้องเป็นวิธีการที่แสดงความแตกต่างของ isozyme pattern ระหว่างพืชอย่างเด่นชัดในทางคุณภาพมากกว่าทางปริมาณ

3) มีความแปรปรวนของ protein or isozyme pattern ในพืชพันธุ์เดียวกันน้อยที่สุด

4) มีเทคนิคการตรวจสอบที่ได้มาตรฐานและมีสถิติเชื่อถือได้

polyacrylamide gel electrophoresis เป็นวิธีการแบบหนึ่งของการทำอิเลคโตรโฟรีซิสในหลาย ๆ วิธี วิธีการแบบนี้จะใช้สารตัวกลางจำพวกเจลที่เป็นสารกึ่งแข็งที่เรียกว่า polyacrylamide gel แต่เดิมนิยมใช้แป้งมัน (potato starch) แต่ในปัจจุบันนิยมใช้ polyacrylamide gel ซึ่งเตรียมขึ้นมาจากสารผสมของ acrylamide และ N,N'-methylene-bis-acrylamide ให้มีขนาดช่องของเนื้อเจล (pore size) ตามต้องการ โมเลกุลของโปรตีนหรือเอนไซม์จะเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ โดยที่โมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้ในอัตราที่เร็วกว่าโมเลกุลใหญ่

การเตรียม polyacrylamide gel ทำได้ 2 แบบคือแบบแท่ง (column gel) และเจลแผ่น (slab gel) สำหรับเจลแท่งนั้นจะใช้สำหรับตัวอย่างพืชหนึ่งตัวอย่างต่อเจลหนึ่งแท่ง แต่เจลแผ่นนั้นสามารถใส่ตัวอย่างเพื่อศึกษาเปรียบเทียบได้คราวละหลาย ๆ ตัวอย่างในเจลแผ่นเดียวกัน

วิธีการแยกโปรตีนโดยวิธี Disc electrophoresis in polyacrylamide gel เป็น zone electrophoresis แบบหนึ่งที่ใช้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ และสามารถใช้จำแนกชนิดของโปรตีนที่ปะปนกันอยู่ให้ออกจากกันได้อย่างละเอียดชัดเจนโดยใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อย แต่ในส่วนของระบบตัวกลางจะประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วนคือ ชั้นตัวอย่างที่อยู่บนสุดมีความหนาประมาณ 1-100 ไมครอน ชั้นถัดลงมาเป็นชั้นของเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ (3-5%) เรียกว่า spacer หรือ stacking gel ขนาดช่องของเนื้อเจลจะมีขนาดใหญ่ สารตัวอย่างจึงเคลื่อนผ่านเจลในชั้นนี้ได้อย่างรวดเร็วแล้วเกิดการสะสมของโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบเป็นชั้น ๆ ตามอัตราการเคลื่อนที่ที่ต่างกันและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั้นล่างสุดเป็นเจลที่มีความเข้มข้นสูง (7.5-12.5%) เรียกว่า running หรือ separating gel ตัวกลางในชั้นนี้จะมีขนาดของช่องเนื้อเจลเล็กลง เพราะเจลมีความเข้มข้นสูง และเตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูง pH สูง โมเลกุลของสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ได้ช้าลงและแบ่งแยกได้ชัดเจนขึ้น

ขนาดของช่องเนื้อเจลเป็นส่วนที่สำคัญมากต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลสารตัวอย่าง ขนาดของช่องเนื้อเจลที่เล็กเกินไปจะทำให้โมเลกุลของสารไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านไปได้ แต่ถ้าขนาดของช่องเนื้อเจลใหญ่เกินไปจะทำให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และไม่สามารถแยกให้เห็นถึงความแตกต่างของกลุ่มโมเลกุลย่อยที่มีขนาดโมเลกุลที่ต่างกันได้ Hames and Rickwood (1981) กล่าวว่า การเตรียมเจลที่ใช้ acrylamide เข้มข้น 3-5% เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 100,000 ขึ้นไป ถ้าเตรียมเจลที่ใช้ acrylamide เข้มข้น 5-12% เหมาะสำหรับแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-150,000 และถ้าเตรียมเจลที่มี acrylamide เข้มข้น 10-15% เหมาะสำหรับแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000-80,000

วิธีการของ polyacrylamide gel electrophoresis มักกำหนดให้ electrode buffer มี pH ประมาณ 2.5-11 แต่โดยทั่วไปแล้วจะให้ระบบอยู่ในสภาพ pH 3-10 ค่าของ pH นี้จะเกี่ยวข้องกับค่าของขนาดและความหนาแน่นของประจุโมเลกุลสารตัวอย่างที่แตกตัว การเลือกใช้ pH ของ electrode buffer ให้อยู่ในค่าเท่าใดนั้นย่อมขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการคงตัวอยู่ได้ของสารตัวอย่าง การตรวจสอบค่า pH ของ electrode buffer ที่จะใช้ในระบบนั้นมักจะเปรียบเทียบจากค่ามาตรฐานของสารตัวอย่างนั้น การใช้ electrode buffer ที่มีค่า pH สูงเกินไปจะทำให้ระยะเวลาในการแยกกลุ่มโมเลกุลของสารสั้นลง แต่จำนวนกลุ่มก็จะลดลงตามไปด้วย การใช้ระดับ pH ที่แตกต่างไปจากค่า pH ของสารตัวอย่างมาก ๆ จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประจุสารตัวอย่างและทำให้การแยกกลุ่มโมเลกุลของสารเปลี่ยนแปลงไป ค่า pH ของโปรตีนส่วนมากจะอยู่ในช่วง 4-7 แต่โดยทั่วไปแล้วจะใช้ electrode buffer ที่มี pH ประมาณ 8.0-9.5

สำหรับการเลือกใช้สารตัวเร่งในการเตรียมเจล (Polymerisation catalyst) นั้น อาจจะใช้สาร ammonium persulphate - TEMED หรือ ribofla-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

vin - TEMED เพียงตัวใดตัวหนึ่งได้ ในการเตรียม stacking gel สามารถใช้สารตัวเร่งได้ทั้ง 2 ตัวเช่นกัน แต่โปรตีนบางชนิดมีปฏิกิริยากับ persulphate ion และจะสูญเสียคุณสมบัติไปได้ ดังนั้นการเตรียม stacking gel จึงนิยมใช้ riboflavin - TEMED เป็นสารตัวเร่งมากกว่าใช้ amonium persulphate - TEMED แต่อย่างไรก็ตามการเดินเครื่องก่อน (per-electrophoresis) การใส่สารตัวอย่างเล็กน้อยจะช่วยขับไล่ persulphate ion ส่วนเกินได้

หลังจากวิธีการอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อให้มีการเคลื่อนที่ของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ไปตามแท่งเจลแล้ว จะมีการนำแท่งเจลนั้นมาย้อมสีโปรตีน (protein staining) เพื่อดูแบบแผนการเคลื่อนที่ของโปรตีน การย้อมสีโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน Gordon (1980) รายงานถึงการใช้สารละลายของ amido black หรือ naphthalene black 10B 0.05% ในกรดอซิติกเข้มข้น 7% เพื่อย้อมสีโปรตีนภายในแท่งเจลโดยการแช่แท่งเจลนั้นไว้ในสารละลายเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมงแล้วจึงนำมาล้างสีส่วนเกิน (destaining) ออกด้วยกรดอซิติกเข้มข้น 7% เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แต่ Gottlieb (1971) บอกว่าการใช้สีย้อม amido black ในความเข้มข้นเท่ากันนี้แช่แท่งเจลเป็นเวลานาน 30 นาทีก็เป็นการพอเพียงแล้ว Sarkar and Bose (1986) รายงานถึงการใช้สี amido black เข้มข้น 0.1% ในการย้อมสีโปรตีน albumins และ globulins ในเอนโดสเพริมของข้าว นอกจากนั้นแล้ว Harnes and Rickwood ได้รายงานถึงการใช้สี Coomassie blue 0.1% ที่ละลายในสารละลายผสมของน้ำ:methanal:glacial acetic acid ในอัตราส่วน 5:5:2 โดยปริมาตร ใช้เวลาในการย้อมสี 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรืออาจจะใช้ silver stain ในการย้อมสีโปรตีนก็ได้เช่นกัน ส่วนการย้อมสีโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์กับสารเริ่มต้นที่ใช้เป็นสีย้อม จะต้องเลือกใช้สารเริ่มต้นต่าง ๆ กันออกไปตามชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการตรวจหา

งานทางด้านอิเลคโตรโฟรีซีสมีประโยชน์มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานด้านการจำแนกพันธุ์พืชได้ใช้วิธีการอิเลคโตรโฟรีซีสกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งจะใช้ได้ทั้งวิธีการตรวจจับโปรตีนโดยทั่วไปหรือการตรวจจับโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะก็ได้ Marie and Horold (1971) ได้ใช้แบบแผนเอนไซม์ peroxidase ที่ได้จากใบแก่ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแยกความแตกต่างของ Datura 10 ชนิด พบว่ามีจำนวนแถบเอนไซม์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันถึง 19 แถบ Yaakov and Wet (1975) ใช้ความแตกต่างของแบบแผนเอนไซม์ esterase, malate duhydrogenase และ peroxidase ที่สะกัดได้จากเมล็ด ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวฟ่าง ๆ สายพันธุ์ Bringhurst et al. (1981) ใช้ความแตกต่างของแบบแผนเอนไซม์ 3 ชนิดคือ แบบแผนของ phosphoglucoisomerase, leucine aminopeptidase และ phosphoglucomutase ในการจำแนกความแตกต่างของสเตอร์เบอรี่ 22 พันธุ์ พบว่าการใช้ความแตกต่างของแบบแผนเอนไซม์ทั้ง 3 แบบจำแนกพันธุ์ได้เพียง 14 พันธุ์เท่านั้น Lin et al. (1984) ใช้แบบแผนของเอนไซม์ esterase และ phosphoglucomutase ที่ได้จากเมล็ดและต้นกล้าในการจำแนกความแตกต่างของหญ้า Kentucky bluegrass จำนวน 24 สายพันธุ์ออกจากกันได้ Kobayashi et al. (1987) ศึกษาแบบแผนของเอนไซม์ 7 ชนิดที่ได้จากใบของ Anthurium andraeanum จำนวน 7 สายพันธุ์ แต่พบว่าการใช้แบบแผนเอนไซม์เพียง 4 ชนิดคือ phosphoglucose isomerase, peroxidase, malate dehydrogenase และ glutamate-oxaloacetate transaminase ก็สามารถจำแนกความแตกต่างได้

นอกจากการใช้ประโยชน์ของอิเลคโตรโฟรีซีสในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชแล้ว ยังใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ได้ด้วย John and Whitney (1983) ใช้แบบแผนของโปรตีน Globulins ที่ได้จากต้นอ่อน (embryo) ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวโพดพันธุ์แท้ Mo17 และ B73 กับลูกผสม B73xMo17 ได้ Kim and Park (1984) ใช้แบบแผนเอนไซม์ malate dehydrogenase และ acid phosphatase ของใบเลี้ยงผักกาดหัวที่มีอายุเพียง 2-3 วัน จำแนกความแตกต่างของพันธุ์แท้ ลูกผสมชั่วที่ 1 ลูกผสมชั่วที่ 2 และลูกผสมกลับได้ Dong et al. (1986) ใช้แบบแผนเอนไซม์ phosphoglucomutase ของใบเลี้ยง Squash อายุ 3 วัน จำแนกความแตกต่างของลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 3 เบอร์ และสายพันธุ์แท้อีก 6 เบอร์ได้ Lee and Park (1986) ใช้แบบแผนเอนไซม์ 6 ชนิด คือ Acid phosphatase, Malate dehydrogenase, Phosphoglucomutase, Phosphoglucose isomerase, Malic enzyme และ 6-Phosphogluconate dehydrogenase ที่สะกัดได้จากใบเลี้ยงแตงกวา ในการจำแนกความแตกต่างของลูกผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั่วที่ 1 จำนวน 3 เบอร์ และพันธุ์แท้ 6 เบอร์ได้ การใช้อิเลคโตรโฟรีซีสในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์นี้เป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน เพราะให้ผลที่แน่นอนและรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved