# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**การทดลองที่ 1** การรวบรวมและศึกษาลักษณะประจำพันธุ์เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ

รวบรวมพันธุ์พริกจากแหล่งปลูกและแหล่งรวบรวมต่างๆ เริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ.2542 แล้วนำมาปลูกดูลักษณะภายนอก โดยคัดพันธุ์ที่มีลักษณะผลห้อยลง และผลมีขนาดค่อนข้างยาวและใหญ่เอาไว้ ส่วนพันธุ์ที่มีขนาดเล็ก และมีก้นผลชี้ขึ้นเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการจะคัดทิ้งไป จากนั้นนำสายพันธุ์พริกที่เลือกเอาไว้มาปลูกเพื่อทำการผสมตัวเอง 3 ครั้ง เพื่อลดความแปรปรวนในสายพันธุ์ และสามารถแยกออกมาเป็นหมายเลขได้ 12 สายพันธุ์ โดยเริ่มปลูกเพื่อผสมตัวเองครั้งแรกที่แปลงทดลองพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2542 เพาะกล้าในถุงดำขนาด 12.7 x 12.7 เซนติเมตร ใช้ส่วนผสมของ ดิน : ขุยมะพร้าว : ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1 : 1 : 1 และย้ายกล้าลงถุงดำขนาด 20.32 x 20.32 เซนติเมตร เมื่อต้นกล้ามีอายุ 30 วันหลังงอก และเริ่มทำการผสมตัวเองเมื่อต้นพริกมีอายุ 45 วันหลังย้ายกล้า ใช้ถุงกระดาษขนาด 1x2 เซนติเมตร ครอบดอกทิ้งไว้ การกำจัดโรคและแมลงพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงจำพวกไรขาวพริก เพลี้ยไฟพริก เพลี้ยอ่อน และแมลงวันหนอนเจาะผล และสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคกุ้งแห้ง และโรคยอดเน่า ทุกๆ 7 วัน มีการให้ปุ๋ยทางใบ และให้ปุ๋ยทางดินเพื่อบำรุงต้น และเมื่อได้พันธุ์แท้ผสมตัวเองชั่วที่หนึ่งนำมาปลูก เพื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะตามที่ต้องการ แต่ละต้นจะผสมตัวเอง เก็บเมล็ดที่ได้มาปลูกเป็นลูกผสมชั่วที่สามต่อไปและคัดต้นลูกผสมชั่วที่สามที่มีลักษณะที่ดีมาปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2543 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในบล็อค (randomized complete block design ;RCBD ) มี 12 หน่วยการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ โดยใช้ขนาดแปลง 1x4 เมตร ระยะระหว่างแถว 50 เซนติเมตร และระยะระหว่างต้น 60 เซนติเมตร ปลูกแถวคู่ แถวละ 6 ต้น ใช้ปุ๋ยคอกรองก้นหลุมประมาณ 20 กรัม/หลุม และผสมปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 ประมาณ 3 กรัม/หลุม อายุกล้าที่ทำการย้าย 30 วัน หลังเพาะเมล็ด และบันทึกลักษณะพืชสวน ได้แก่ สีผลอ่อน สีผลแก่ การวางตัวของผล ลักษณะผล ความยาวผล ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม โดยเริ่มบันทึกเมื่อต้นพริกที่อายุประมาณ 90 วัน ตามแบบแผนของ (IBPGR,1983) เพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการเพื่อนำมาใช้เป็นสายพันธุ์พ่อที่ดีต่อไป

**แบบบันทึกลักษณะทางพืชสวนของพริก( IBPGR,1982)**

1. ช่อดอกและผล (inflorescence and fruit)

1.1 สีของผลอ่อน (fruit color in immature stage)

คะแนน

| | |
|---|---|
| 1 | เขียว (green) |
| 2 | เหลือง (yellow) |
| 3 | ส้ม (orange) |
| 4 | แดง (red) |
| 5 | ม่วง (purple) |
| 6 | น้ำตาล (brown) |
| 7 | ดำ (black) |
| 8 | อื่นๆ |

1.2 สีของผลแก่ ( fruit color in mature stage)

คะแนน

| | |
|---|---|
| 1 | เขียว (green) |
| 2 | เหลือง (yellow) |
| 3 | ส้ม (orange) |
| 4 | แดง (red) |
| 5 | ม่วง (purple) |
| 6 | น้ำตาล (brown) |
| 7 | ดำ (black) |
| 8 | อื่นๆ |

1.3 ลักษณะการวางตัวของผล (fruit position )

คะแนน

| | |
|---|---|
| 3 | ห้อยลง (declining) |
| 5 | ระดับปานกลาง (intermediate) |
| 7 | ผลตั้ง (erect) |

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

1.4 ความยาวผล (fruit length)

คะแนน

1 สั้นมาก (น้อยกว่า 1 เซนติเมตร)

3 สั้น (น้อยกว่า 5 เซนติเมตร)

5 ปานกลาง (ประมาณ 10 เซนติเมตร)

7 ยาว (ประมาณ 15 เซนติเมตร)

9 ยาวมาก (มากกว่า 25 เซนติเมตร)

1.5 ลักษณะผล (fruit shape)

คะแนน

1 ผลยาว (elongate)

2 ผลป้อม (oblate )

3 ผลกลม (round)

4 ผลรูปกรวยปลายแหลม (conical)

5 ผลที่หดตัวในส่วนปลายผล (campanulate)

6 ผลรูประฆัง (bell or blocky)

1.6 ความมีรสของผล

คะแนน

0 รสจืด (not pungent or sweet)

3 มีรสเล็กน้อย (low)

5 มีรสปานกลาง (intermediate)

7 มีรสจัดมาก (high)

1.7 การติดผล (fruit set)

คะแนน

3 ต่ำ (low)

5 ปานกลาง (intermediate)

7 สูง (high)

1.8 ความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ (male sterility)

คะแนน

0 ไม่มี (absent)

1 มี (present)

1.9 ความกว้างของผล (fruit width) วัดเป็นเซนติเมตรในส่วนของผลที่กว้างที่สุด

2. ลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้น (plant growth habit)

2.1 ลักษณะทรงพุ่ม(plant growth habit)

3 ต้นเตี้ยแผ่กิ่งก้านสาขา(prostrate)

5 ทรงพุ่ม (compact)

7 ทรงต้นสูง (erect)

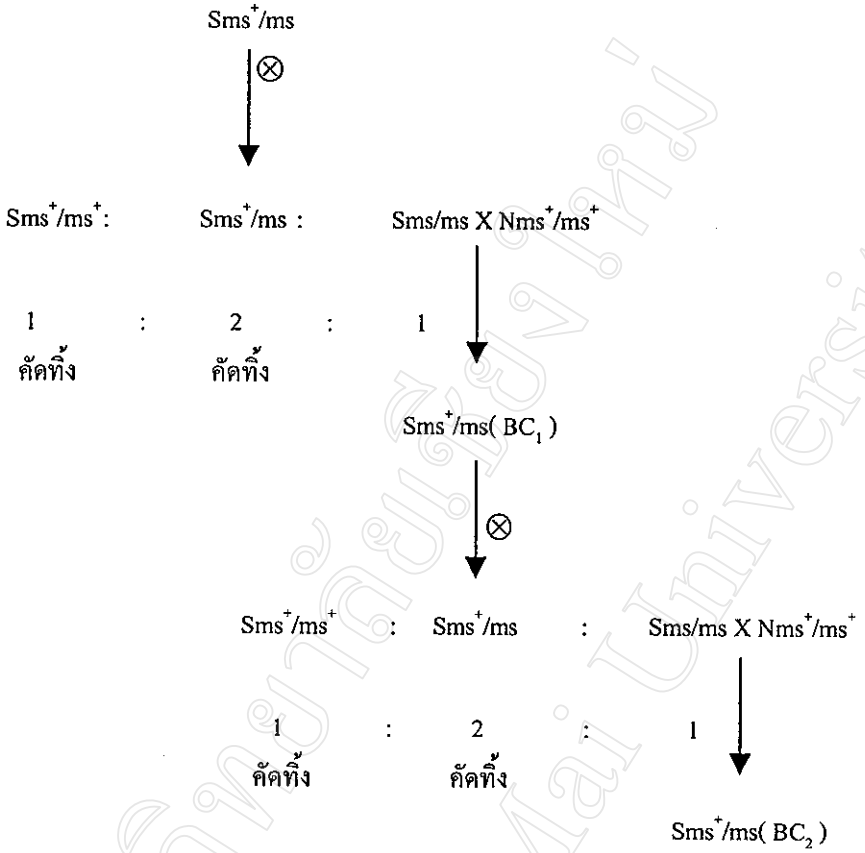
2.2 ความสูงของต้น ( plant height) วัดเป็นเซนติเมตรจากระดับผิวดินถึงส่วนสูง

2.4 ความกว้างของทรงพุ่ม( plant width) วัดเป็นเซนติเมตรในส่วนที่กว้างสุด

**การทดลองที่ 2 การผสมพันธุ์**

2.1 การผสมกลับเพื่อปรับปรุงความเผ็ดในสายพันธุ์แม่

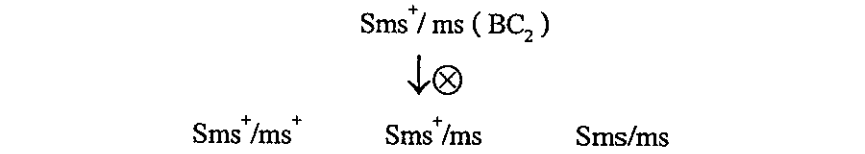
คัดเลือกลูกผสมชั่วที่หนึ่งที่มีจีโนไทพ์ คือ S $ms^+$ / ms โดยคัดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่งที่ให้ผลผลิตสูงและมีความเผ็ดสูง นำมาผสมตัวเองโดยใช้ถุงกระดาษ ขนาด 2x2 เซนติเมตร ครอบดอกพริกเอาไว้ไม่ให้แมลงมารบกวน แล้วแกะถุงออก จากนั้นปล่อยให้ติดผล รอให้ผลพริกแก่เป็นสีแดงจัด จึงนำมากะเทาะเมล็ดตากให้แห้ง เพื่อปลูกเป็นลูกผสมชั่วที่สองต่อไป ปลูกลูกผสมชั่วที่สองที่มีการกระจายตัวของลูกผสมชั่วที่หนึ่งมีลักษณะยีนดังนี้ คือ $Sms^+/ms^+$ $Sms^+/ms$และ Sms/ms โดยย้ายกล้าหลังเมล็ดงอก 30 วัน ลงในถุงดำขนาด 12.7 x 12.7 เซนติเมตร หลังจากนั้น 45 วัน พริกออกดอกแรก คัดเลือกลักษณะ S ms/ms โดยสังเกตลักษณะของอับละอองเกสรเพศผู้ที่ไม่มีการพัฒนาหรือมีรูปแบบที่ผิดปกติไปจากต้นอื่นๆ แล้วคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดังกล่าวเอาไว้ ส่วนต้นที่มีเกสรเพศผู้ปกติคัดทิ้ง จากนั้นนำต้นที่คัดเลือกเอาไว้มาย้ายลงปลูกในถุงดำที่มีขนาด 20.32 x 20.32 เซนติเมตร เพื่อสะดวกในการดูแลแล้วจึงนำสายพันธุ์พ่อซึ่งมีความเผ็ดสูงจะมียีนเกสรเพศผู้ปกติ ( N $ms^+$ / $ms^+$) มาผสมกลับเพื่อปรับปรุงความเผ็ดโดยจะผสมกลับ 2 ครั้ง ดังภาพ 4




ภาพ 4 แสดงการผสมกลับเพื่อปรับปรุงความเผ็ดของสายพันธุ์แม่

2.2 การผสมข้ามเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง

การผสมข้ามพันธุ์พริกเริ่มจากการคัดเลือกต้นแม่ที่มีลักษณะดอกที่มีเกสรเพศผู้ฝ่อ โดยคัดเลือกจากสายพันธุ์แม่ที่ผสมกลับครั้งที่สอง ( S $ms^+$ / ms ; $BC_2$ ) นำมาผสมตัวเองอีกครั้งเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของยีนด้อยที่แสดงลักษณะของเกสรเพศผู้ฝ่อออกมาดังภาพ 5




อัตราส่วน 1 : 2 : 1

หมายเหตุ $Sms^+/ms^+$ และ $Sms^+/ms$ คือ ต้นที่มีลักษณะของเกสรเพศผู้ปกติ

Sms/ms คือ ต้นที่มีลักษณะของเกสรเพศผู้ฝ่อ

ภาพ 5 แสดงการกระจายตัวของยีนด้อยที่แสดงลักษณะความเป็นหมันของเกสรเพศผู้

นำเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองนี้มาปลูกในกระบะเพาะกล้า สายพันธุ์ละ 100 ต้น เมื่อต้นกล้ามีอายุ 30 วัน จึงย้ายใส่ถุงดำขนาด 20.32 x 40.64 เซนติเมตร เพื่อสะดวกในการคัดแยก และดูแลรักษา เมื่อต้นกล้าอายุ 45 วันหลังย้ายปลูก ตรวจดูดอกที่มีเกสรเพศผู้ฝ่อดังภาพ 6 คัดต้นที่มีเกสรเพศผู้ปกติออก เมื่อได้สายพันธุ์แม่ที่มีลักษณะที่ต้องการแล้วจึงนำละอองเกสรเพศผู้จากต้นสายพันธุ์พ่อ ได้แก่ สายพันธุ์ 1-3-7 3-3-7 และ 4-3-7 จากแหล่งปลูกอื่นผสม โดยเก็บเกสรจากสายพันธุ์พ่อมาผสมกับดอกของสายพันธุ์แม่ซึ่ง คือ สายพันธุ์ 2735#14$BC_2$ 2735#16$BC_2$ 2740#10$BC_2$ ที่ดอกกำลังเริ่มบาน ระยะเวลาที่ใช้ในการผสม คือ 8.30-11.00 น. ได้ลูกผสมสายพันธุ์ต่อไปนี้ 2735#14$BC_2$ X 1-3-7 2735#14$BC_2$ X 3-3-7 2735#14$BC_2$ X 4-3-7 2735#16$BC_2$ X 1-3-7 2735#16$BC_2$ X 3-3-7 2735#16$BC_2$ X 4-3-7 2740#10$BC_2$ X 1-3-7 2740#10$BC_2$ X 3-3-7 2740#10$BC_2$ X 4-3-7 หลังจากการผสมประมาณ 90 วัน ผลเริ่มสุกแดงและเก็บเมล็ดได้

ภาพ 6 ลักษณะดอกของสายพันธุ์ที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน(ดอกขวามือ) และเกสรเพศผู้ปกติ (ดอกซ้ายมือ)

**การทดลองที่ 3 การปลูกทดสอบพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง**

การปลูกทดสอบพันธุ์พริกลูกผสมชั่วที่หนึ่ง โดยใช้แปลงทดลองของภาควิชาพืชสวนคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพาะกล้าในกระบะเพาะโดยใช้วัสดุเพาะกล้าแบบสำเร็จรูป เมื่อกล้าอายุได้ 30 วัน จึงย้ายกล้าลงแปลงปลูกขนาด กว้าง 1 เมตร ยาว 4 เมตร คลุมด้วยพลาสติกเพื่อป้องกันวัชพืช โดยปลูกสายพันธุ์พ่อ 3 พันธุ์ ลูกผสม 9 พันธุ์ ได้แก่ 2735#14$BC_2$ x 1-3-7 2735#14$BC_2$ x 3-3-7 2735#14$BC_2$ x 4-3-7 2735#16$BC_2$ x 1-3-7 2735#16$BC_2$ x 3-3-7 2735#16$BC_2$ x 4-3-7 2740#10$BC_2$ x 1-3-7 2740#10$BC_2$ x 3-3-7 และ 2740#10$BC_2$ x 4-3-7 เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกอีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พริกหนุ่มจอมทอง2 พริกหนุ่มสันป่าตอง และ พริกหนุ่มเขียว แบ่งเป็น 3 ซ้ำ ระยะปลูกระหว่างแถว 50 เซนติเมตร ระยะระหว่างต้น 50 เซนติเมตร ปลูกแถวคู่ แถวละ 10 ต้น จำนวนทั้งหมด 20 ต้น ดังที่แสดงไว้ในภาพ 7 ใส่ปุ๋ยคอกรองก้นหลุม และปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 10 กรัมต่อ 1 หลุมและผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ให้น้ำทุกวันในระยะแรก เมื่อต้นกล้าโตเต็มที่จึงเปลี่ยนเป็นให้น้ำแบบปล่อยท่วมแปลง โดยให้น้ำทุกๆ 7-10 วัน ให้ปุ๋ยทางใบทุกๆ 7-10 วัน และฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง และสารเคมีควบคุมเชื้อราทุกๆ 7-10 วัน เมื่อต้นกล้าอายุได้ 45 วันหลังย้ายกล้าจะเริ่มทยอยออกดอก และให้ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 50กรัม ทุกๆ 7 วัน ประเมินผลทดสอบพันธุ์โดยวัดความยาวผล ความกว้างผล น้ำหนักผล ผลผลิตต่อต้น ผลผลิตต่อเฮกแตร์ และเปรียบเทียบความดีเด่นของลูกผสม(heterosis)ในด้านผลผลิตกับสายพันธุ์พ่อ โดยค่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นเนื่องจากเปอร์เซ็นต์ heterosis ( ดำเนิน,2541) ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ยของลูกผสมต่อต้น} - \text{ค่าเฉลี่ยของพ่อที่สูงกว่า}}{\text{ค่าเฉลี่ยของพ่อ}} \times 100\%$$

ภาพ 7 แปลงทดสอบสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่งเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและพันธุ์การค้า

**การทดลองที่ 4 การศึกษาการใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสเพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบลูกผสม**

การใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่งที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน โดยดัดแปลงวิธีการทดลองมาจากวิธีการของ Mc Leod *et al.*(1983) ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำพริกสายพันธุ์พ่อ ได้แก่ 1-3-7 3-3-7 4-3-7 สายพันธุ์แม่ ได้แก่ 2735$BC_2$#14 2735$BC_2$#16 2740$BC_2$#10และสายพันธุ์ลูกผสมอีกจำนวน 9 พันธุ์ ได้แก่ 2735$BC_2$#14 x 1-3-7 2735$BC_2$#14 x 3-3-7 2735$BC_2$#14 x 4-3-7 2735$BC_2$#16 x1-3-7 2735$BC_2$#16 x 3-3-7 2735$BC_2$#16 x 4-3-7 2740$BC_2$#10 x1-3-7 2740$BC_2$#10 x 3-3-7 และ 2740$BC_2$#10 x 4-3-7 ปลูกลงในถาดเพาะกล้า และย้ายลงปลูกในแปลง เมื่ออายุกล้า 30 วันหลังเมล็ดงอก นำเอาส่วนใบอ่อนมาชั่งน้ำหนัก 2 กรัม แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดสารตัวอย่างจากพืช

นำใบพริกที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส มาบดในโกร่ง เติมสารสกัดเอนไซม์ 3 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดเอา supernatant ที่ได้นำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วดูดเอา supernatant ที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด

3 มิลลิลิตร แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส โดยแบ่ง supernatant ที่ได้ทั้งหมดใส่หลอดทดลองไว้ในปริมาณ 90 ไมโครลิตรต่อหลอด เพื่อที่จะใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส แต่ละครั้งให้เพียงพอและจะทำให้เอนไซม์ไม่เสื่อมสภาพเร็วเนื่องจากการนำเอนไซม์ออกมาจากตู้เย็น เมื่อจะทำการวิเคราะห์จึงผสม supernatant 90 เปอร์เซ็นต์ กับ marker 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน

3. การเตรียมเจล

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส ใส่ running gel ที่เตรียมไว้สูงเท่ากับระดับลูกศร แล้วใส่น้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อย เพื่อทำให้ผิวหน้าเจลเรียบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เจลเกิดโพลิเมอไรเซชั่น แล้วใส่ stacking gel พร้อมกับเสียบ comb ขนาดจำนวน 15 ช่อง ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เจลเกิดโพลิเมอไรเซชั่นอีกครั้ง จึงนำเอา comb ออก แล้วล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น

4. การประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส เติม electrode buffer ลงใน chamber ให้ระดับของ electrode buffer อยู่เหนือขอบกระจกด้านล่าง ประมาณ 1-2 นิ้ว และเติม electrode buffer ให้พอดีกับขอบกระจกด้านบน เพื่อให้เกิดการเคลื่อนที่ของประจุ

5. การหยอดตัวอย่าง

เขย่าสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ให้เข้ากัน หยอดสารตัวอย่างลงบนเจลในแต่ละช่องๆ ละ 1 ตัวอย่างๆ ละ 75 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างแพร่กระจาย ปิดฝาครอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส ต่อขั้วกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

6. การผ่านกระแสไฟฟ้า

ในช่วงแรก ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 30 มิลลิแอมแปร์ เมื่อสารตัวอย่างที่มี marker เคลื่อนที่ใน stacking gel เป็นแนวเส้นตรงแล้วจึงเปลี่ยนมาใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ที่ 250-300 โวลต์ รอจนกระทั่งระดับของ marker อยู่ห่างจากขอบด้านล่างของกระจกประมาณ 2-3 เซนติเมตร จึงหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส

7. การย้อมสี

นำแผ่นเจลที่ได้มาแกะแผ่นกระจกที่ประกบเจลออก แล้วตัดมุมล่างของเจลด้านขวาถ้าเจลติดอยู่บนแผ่นกระจกแผ่นใหญ่เพื่อทำเครื่องหมายลำดับของตัวอย่าง นำเจลแช่ลงในสารละลายสำหรับย้อมสีในที่มืด เพื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นของเอนไซม์แต่ละชนิด ดังนี้

7.1 เอนไซม์ acid phosphatase

| | |
|---|---|
| 1. acetate buffer 0.5 M pH 4.8 | 150.0 มิลลิลิตร |
| 2. fast blue-B salt | 150.0 มิลลิกรัม |
| 3. 1%- napthyl acid phosphate(monosodiumsalt) | 150.0 มิลลิกรัม |
| 4. $MgCl_2$ 10% | 10 หยด |

นำสารในข้อ 1,2 และ 3 ละลายให้เข้ากัน กรองในที่มืดแล้วเติมสารในข้อ 4 ลงไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทสารละลายสีย้อมลงไปในกล่องพลาสติกที่มีเจลอยู่ท่วม เขย่าเบาๆวางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเห็นแถบสีคมชัด จึงเทสารละลายย้อมสีออกให้หมดแล้วเทสารละลาย acetic acid 7 % ที่มีส่วนผสมของ acetic acid : กลีเซอรอล : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 7:10:83 ให้ท่วมแผ่นเจล เพื่อล้างสีส่วนเกินออกและคงสภาพของสีเอาไว้

7.2 เอนไซม์ esterase

| | |
|---|---|
| 1. phosphate buffer 0.1 M pH6.0 | 150.0 มิลลิลิตร |
| 2. fast blue-B salt | 225.0 มิลลิกรัม |
| 3. 1% napthyl acetate ใน absolute alcohol | 4.5 มิลลิลิตร |

นำสารในข้อ 1 และ 2 ละลายให้เข้ากันในที่มืด แล้วเติมสารในข้อ 3 ลงไป ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทสารละลายสีย้อมลงไปในกล่องพลาสติกที่มีเจลอยู่ท่วม เขย่าเบาๆ วางไว้ในที่มืดจนเห็นแถบสีคมชัด จึงเทสารละลายย้อมสีออกให้หมด แล้วเทสารละลาย acetic acid 7% ให้ท่วมแผ่นเจล เพื่อล้างสีส่วนเกินออกและคงสภาพของสีเอาไว้

7.3 เอนไซม์ peroxidase

| | |
|---|---|
| stock A : 3amino-9ethylcarbazole | 420.0 มิลลิกรัม |
| β-napthol | 290.0 มิลลิกรัม |
| acetone | 200.0 มิลลิลิตร |

นำสารทั้งหมดละลายให้เข้ากัน

| | |
|---|---|
| stock B : tris buffer 0.1 M pH 4.0 | |
| tris-hydroxymethyl aminomethane | 3.78 กรัม |
| acetic acid | 4.05 กรัม |

นำสารทั้งหมดละลายให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2.5 ลิตร ที่ pH 4.0

| | |
|---|---|
| stock C : $H_2O_2$ 3% | |
| $H_2O_2$ 30% | 10.0 มิลลิลิตร |

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร(เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

นำ stock A : stock B : stock C ในอัตราส่วน 20:80:1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทสารละลายสีย้อมลงไปในกล่องพลาสติกที่มีเจลอยู่ท่วม เขย่าเบาๆ วางไว้ในที่มืด จนเห็นแถบสีคมชัด จึงเทสารละลายย้อมสีออกให้หมด แล้วเทสารละลาย acetic acid 7% ให้ท่วมแผ่นเจล เพื่อล้างสีส่วนเกินออกและคงสภาพสีเอาไว้

8. การบันทึกข้อมูล

การวัดระยะทางที่เกิดแถบสีแต่ละแถบของไอโซไซม์ และระยะทางที่สารตัวอย่างที่มี marker เคลื่อนที่ และบันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์แต่ละพันธุ์ของพริกที่ได้เป็นภาพถ่ายของแถบสี และวาดแผนภาพ zymogram ของไอโซไซม์ดังกล่าว แสดงตำแหน่งจำนวน และขนาดของแถบสี วัดการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี ตามสมการข้างล่างนี้

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker}}$$

**การทดลองที่ 5 การหาปริมาณสารแคบไซซินในพริก**

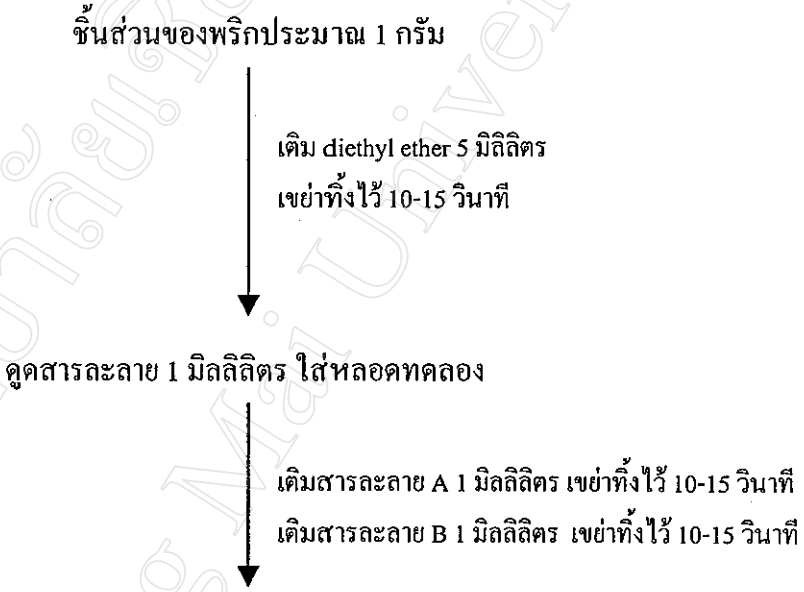
ทดสอบหาปริมาณสารแคบไซซินในพริกสายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ พริกลูกผสมชั่วที่หนึ่งของนงลักษณ์ (2542) ได้แก่ ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง KY1-1 x พริกบางช้าง (2735) ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง CF21789 x พริกบางช้าง ( 2740) ลูกผสมกลับครั้งที่ 1 ได้แก่ $2735BC_1$#14 $2735BC_1$#16 และ $2740BC_1$#10 ลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ได้แก่ $2735BC_2$#14 $2735BC_2$#16 และ $2740BC_2$#10 เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจากการผสมกลับ 2 ครั้ง และเปรียบเทียบปริมาณสารแคปไซซินของพริกสายพันธุ์พ่อ ได้แก่ 1-3-7 3-3-7 และ 4-3-7 พริกพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง ได้แก่ $2735BC_2$#14 x 1-3-7 $2735BC_2$#14 x 3-3-7 $2735BC_2$#14 x 4-3-7 $2735BC_2$#16 x 1-3-7 $2735BC_2$#16 x 3-3-7 $2735BC_2$#16 x 4-3-7 $2740BC_2$#10 x1-3-7 $2740BC_2$#10 x 3-3-7 และ $2740BC_2$#10 x 4-3-7 พริกพันธุ์การค้า ได้แก่ พริกหนุ่มจอมทอง 2 พริกหนุ่มสันป่าตอง พริกหนุ่มเขียว นำพันธุ์พริกข้างต้นมาทดสอบหาปริมาณสารแคปไซซิน โดยวิธีการของ Anan *et al.* (1996) ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน

**การสกัดสาร**

นำผลพริกแก่จัดถึงใกล้สุก 23 สายพันธุ์มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีส่วนไส้ติดอยู่ด้วย จำนวน 1 กรัม นำมาแช่ใน diethylether 5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 10 –15 วินาที ใช้ปิเปตดูดเอาส่วน

ที่เป็นของเหลวมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย sodium hydroxide 0.5 N 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 วินาที แล้วเติมสารละลาย ferric chloride 1 เปอร์เซ็นต์ กับ สารละลาย potassium ferriccyanide 1 เปอร์เซ็นต์ กับ กรด hydrochloric เข้มข้น ที่เป็นอินดิเคเตอร์ 3 มิลลิลิตร ตามขั้นตอนในภาพ 8

**ขั้นตอนการสกัดสารแคบไซซินจากผลพริก**




ภาพ 8 แสดงขั้นตอนการสกัดสารแคปไซซิน

หมายเหตุ

1. สารละลาย A ประกอบด้วย sodium hydroxide 2 กรัม และ sodium chloride 2 กรัม ละลายให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. สารละลาย B ประกอบด้วย ferric chloride 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร potassium ferricyanide 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร และ ไตเตรทกรด hydrochloric เข้มข้น 5 มิลลิลิตร สาร B นี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งเพราะเป็นสารที่มีสภาพไม่คงที่

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

**การประเมินผล**

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้กับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบความดีเด่นของลูกผสมในด้านความเผ็ด และทดสอบโดยใช้คนชิมจำนวน 10 คน การหาค่าความดีเด่นของลูกผสมในด้านความเผ็ดหาได้จาก

$$\frac{\text{ค่าความเผ็ดของลูกผสม} - \text{ค่าความเผ็ดของสายพันธุ์พ่อแม่ที่ดี}}{\text{ค่าความเผ็ดของสายพันธุ์พ่อแม่ที่ดี}} \times 100 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University