บทที่ 7

การใช้อิเลคโตรโฟรีซีสในการแยกชนิดพริก

การศึกษาความแตกต่างระหว่างพืชแต่ละพันธุ์หรือแต่ละชนิด ส่วนใหญ่จะใช้ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเป็นแนวทางในการจำแนกตามกฎเกณฑ์ที่ตั้งขึ้นมาเพื่อใช้เฉพาะกับพืชนั้น ๆ แต่ในบางครั้งพบว่าการใช้กฎเกณฑ์ดังกล่าวนั้นใช้ไม่ได้กับพืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากเกินไป ทั้งนี้เป็นเพราะว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาอาจจะมีความคล้ายคลึงกันได้มาก แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกันในทางชีวเคมีแล้วจะพบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

สารประกอบหลายอย่างที่มีอยู่ภายในต้นพืชสามารถนำมาใช้บ่งบอกถึงความแตกต่างของพืชได้ เช่นความแตกต่างในโครงสร้างบางโมเลกุลของกรดอมิโนที่เรียงลำดับแตกต่างกัน เป็นผลให้ประจุไฟฟ้ารวม ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกันไปด้วย จากคุณสมบัติดังกล่าวนี้เมื่อมีการศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนหรือไอโซไซม์โดยวิธีการของอิเลคโตรโฟรีซีส ก็จะแยกโมเลกุลที่มีความแตกต่างกันของประจุและน้ำหนักโมเลกุลโดยอาศัยการเคลื่อนย้ายของโมเลกุลนั้น ๆ ในตัวกลางที่มีกระแสไฟฟ้าไหลผ่าน แล้วนำไปย้อมสีเพื่อตรวจจับ ก็จะปรากฏแถบสีเฉพาะของสารประกอบนั้น ๆ แล้วนำมาเปรียบเทียบเพื่อจำแนกสายพันธุ์หรือพันธุ์พืชได้

วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาถึงแบบแผนการกระจายตัวของโปรตีนในพริก 47 สายพันธุ์ เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์พริกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสะกัดโปรตีนแบบหยาบ (Crude protein extract) (Ozeki, 1983)

นำใบพริกที่เจริญเติบโตเต็มที่ของกลุ่มผสมข้ามพันธุ์และผสมข้ามชนิดจำนวน 47 สายพันธุ์ เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชะงักการทำงานของโปรตีน

นำใบพริกแช่แข็งแต่ละเบอร์หนัก 3.0 กรัมบดในโกร่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (โกร่งเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) พร้อมกับทรายที่ล้างด้วยกรดแล้วหนัก 1 กรัม และ tris-buffer 0.1 M pH 8.2 จำนวน 5 ซีซี แล้วนำมากรองผ่านผ้าขาวบางสองชั้น จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 30 นาที

นำของเหลวใสที่อยู่ตอนบนของหลอดเหวี่ยงใส่ในขวด vial ที่มีกลีเซอรีน 0.1 ซีซีอยู่ เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

<u>หมายเหตุ</u> การเตรียมสารละลาย tris-buffer 0.1 M pH 8.2

รวมสารละลายของ tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.1 M (12.1 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 ซีซี) จำนวน 50 ซีซี เข้ากับสารละลายของกรดไฮโดรคลอริก 0.1 M จำนวน 21.9 ซีซี เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมเป็น 200 ซีซี

เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิตู้เย็น

2. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution)

2.1 สารละลายเข้มข้น A pH 8.9

นำ tris-buffer 36.6 กรัม และ TEMED (N, N, N', N'-tetramethylenediamine) 0.23 ซีซี ละลายในน้ำกลั่น 20 ซีซี ปรับ pH ให้ได้ 8.9 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ซีซี

เก็บในขวดสีชาอุณหภูมิตู้เย็น

2.2 สารละลายเข้มข้น B pH 6.7

นำ tris-buffer 5.98 กรัม และ TEMED 0.64 ซีซี ละลายในน้ำกลั่น 20 ซีซี เติมกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 N จำนวน 48 ซีซี ปรับ pH ให้ได้ 6.7 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ซีซี

เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิตู้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 สารละลายเข้มข้น C

ละลาย acrylamide 28 กรัมและ bisacrylamide 0.735 กรัมในน้ำกลั่น 20 ซีซี เติมน้ำให้ครบ 100 ซีซี กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในอุณหภูมิตู้เย็น

2.4 สารสะลายเข้มข้น D

ละลาย acrylamide 15.0 กรัม และ bisacrylamid 2.5 กรัม ในน้ำกลั่น 20 ซีซี เติมน้ำให้ครบ 100 ซีซี กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในอุณหภูมิตู้เย็น

2.5 สารละลายเข้มข้น E

ละลาย riboflavin 4.0 มิลลิกรัมในน้ำ 100 ซีซี เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิตู้เย็น

2.6 สารละลายเข้มข้น F

ละลาย ammonium persulphate 0.14 กรัมในน้ำ 100 ซีซี เก็บในอุณหภูมิตู้เย็น มีอายุใช้งานได้ไม่เกิน 7 วัน

2.7 สารละลายเข้มข้น electrode buffer

ละลาย tris-buffer 6.0 กรัมและ glycine 28.8 กรัมในน้ำกลั่น 200 ซีซี ปรับ pH ให้ได้ 8.3 เติมน้ำให้ครบ 1,000 ซีซี เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิตู้เย็น เมื่อจะใช้ให้เติมน้ำกลั่นไปอีก 10 เท่า

3. การเตรียมเจล (Acrylamide gel)

3.1 การเตรียม running หรือ separating gel

ผสมสารละลายเข้มข้น A:C:F:น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:2:4:1 คนให้เข้ากัน นำไปเทลงในหลอดแก้วกลวงโปร่งใสรูปทรงกระบอก ที่มีความยาวของหลอด 7.5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 0.7 เซนติเมตร และปิดปลายด้านหนึ่งให้แน่นด้วยแผ่นพลาสติก ให้มีความสูงของสารละลาย 6 เซนติเมตร ทำให้ผิวหน้าเจลเรียบโดยหยดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ช้า ๆ สูง 2-3 มิลลิเมตรเหนือผิวเจล

ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวเป็นเวลานาน 90 นาที

3.2 การเตรียม Stacking หรือ spacer gel

ผสมสารละลายเข้มข้น B:D:F:น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 % ในอัตราส่วน 1:2:1:4 คนให้เข้ากัน นำไปเทลงในหลอดแก้วเดิมที่เตรียม running gel ไว้ให้มีความสูงของสารละลายประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วเทน้ำไปเพื่อล้างน้ำกลั่นที่ค้างอยู่หน้าเจลออก เทสารละลายเดิมซ้ำลงไปอีกครั้งหนึ่งให้มีความสูง 1 เซนติเมตร ทำให้ผิวหน้าเจลเรียบโดยหยดน้ำกลั่นลงไปเช่นเดิม

ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 90 นาที

4. การแยกแถบโปรตีน (Protein banding separation)

ดึงแผ่นพลาสติกที่อยู่ด้านล่างหลอดเจลที่เตรียมไว้ทิ้งไปติดตั้งหลอดเจลเข้ากับช่องของ upper chamber โดยยึดหลอดให้ตั้งตรงและติดแน่น ล้างผิวหน้าเจล 4-5 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น วาง upper chamber ลงบน lower chamber ที่บรรจุ electrode buffer ไว้แล้ว โดยให้หลอดเจลจุ่มลงใน electrode buffer เติม electrode buffer ลงใน upper chamber ให้เต็ม

หยดสารละลายที่สะกัดโปรตีนของพริกแต่ละอย่างลงในหลอดเจลแต่ละหลอดอย่างช้า ๆ ประมาณ 5-50 ul เติม bromophenol blue 0.02% และซูโครสเข้มข้น 10% ลงไป 1-2 หยด

ไล่ฟองอากาศออกจากส่วนล่างของเจลให้หมด ต่อสายไฟจากเครื่องจ่ายกระแสไฟเข้ากับเครื่องแยกเอนไซม์ โดยให้ upper chamber ต่อกับขั้วลบ และ lower chamber ต่อกับขั้วบวก

เปิดมอเตอร์ให้มีการไหลเวียนของ electrode buffer ระหว่าง lower chamber กับ upper chamber

เดินเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า 2 mA ต่อหลอดไปจนกระทั่งเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนไปอยู่ห่างจากปลายหลอดด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

นำเจลออกจากหลอดแก้วโดยใช้ปลายเข็มของกระบอกฉีดยาที่บรรจุน้ำฉีดดันเจลออกช้า ๆ จนกระทั่งเจลหลุดออกมาจากหลอด (rimming) นำเจลที่ได้ไปย้อมสี amido black (50 มิลลิกรัมในกรดอซิติก 7% จำนวน 100 ซีซี) เป็นเวลานาน 30 นาที

ล้างเจลที่ผ่านการย้อมสีในกรดอซิติกเข้มข้น 7% นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงล้างซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้งด้วยกรดอซิติกเข้มข้น 7% จนกระทั่งเจลส่วนที่เป็นฉากใส

เก็บรักษาเจลไว้ในกรดอซิติกเข้มข้น 7%

5. การถ่ายภาพ

นำเจลมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด วางลงในถาดแก้วใสพื้นแบนเรียบ เติมน้ำลงในถาดให้สูงท่วมเจลพอดี

นำถาดดังกล่าววางบนกล่องสีขาวนวลที่มีหลอดไฟอยู่ภายใน ปิดไฟในห้องถ่ายภาพให้หมดให้เหลือเฉพาะไฟในกล่อง แล้วจึงถ่ายภาพ

ผลการทดลอง

7.1 แบบแผนโปรตีนของพริกผสมข้ามพันธุ์

จากการศึกษาถึงแบบแผนการเคลื่อนที่ของโปรตีน (ตารางที่ 8) ที่ปรากฏใน running gel ของพริกพันธุ์พ่อ แม่และลูกผสมข้ามระหว่างพันธุ์ทั้งหมด พบว่ามีการเคลื่อนตัวของโปรตีนที่แยกออกเป็นแถบชัดเจน ได้ทั้งหมดไม่เกิน 7 แถบ แถบที่หนึ่งเป็นแถบที่โปรตีนมีการเคลื่อนตัวออกมาห่างจากจุดเริ่มต้น (ขั้วลบ) ประมาณ 0.5 เซนติเมตร แถบทั้งสองมีระยะการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 0.7 เซนติเมตร แถบที่สามมีการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 0.9 เซนติเมตร แถบที่สี่มีการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 1.7 เซนติเมตร แถบที่ห้ามีการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 1.9 เซนติเมตร แถบที่หกมีการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 2.2 เซนติเมตร และแถบที่เจ็ดมีการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 3.2 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำแท่งเจลที่เป็นแบบแผนการเคลื่อนที่ของโปรตีนของพริกพันธุ์พ่อ แม่และลูกผสมมาเปรียบเทียบกัน ก็จะเห็นความแตกต่างของแบบแผนฯที่เกิดขึ้นได้ชัดเจน

ตารางที่ 8 จำนวนแถบและหมายเลขแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นบนแท่งเจลของพริกทั้ง 41 เบอร์

เบอร์พริก	จำนวนแถบที่เกิดขึ้น	หมายเลขแถบ
92	4	1, 2, 4 และ 7
2	4	1, 2, 5 และ 7
2 x 92	5	1, 2, 4, 5 และ 7
45	5	1, 2, 4, 5 และ 7
45 x 92	5	1, 2, 4, 5 และ 7
59	5	1, 2, 4, 5 และ 7
59 x 92	2	2 และ 5
60	6	1, 2, 4, 5, 6 และ 7
60 x 92	5	1, 2, 4, 5 และ 7
64	5	1, 4, 5, 6 และ 7
64 x 92	5	1, 2, 4, 5 และ 7
66A	5	2, 4, 5, 6 และ 7
66A x 92	4	2, 4, 6 และ 7
67A	5	2, 4, 5, 6 และ 7
67A x 92	5	1, 2, 4, 5 และ 6
68	5	1, 2, 4, 6 และ 7
68 x 92	6	1, 2, 4, 5, 6 และ 7
69A	6	1, 2, 4, 5, 6 และ 7
69A x 92	4	1, 2, 4 และ 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เบอร์พริก	จำนวนแถบที่เกิดขึ้น	หมายเลขแถบ
69E	3	1, 4 และ 7
69E x 92	5	1, 2, 4, 5 และ 7
70B	4	1, 2, 4 และ 7
70B x 92	5	1, 2, 4, 5 และ 7
70C	5	1, 2, 5, 6 และ 7
70C x 92	5	2, 4, 5, 6 และ 7
76	5	1, 2, 4, 5 และ 7
76 x 92	5	1, 2, 4, 5, 6 และ 7
107	5	1, 2, 4, 5 และ 7
107 x 92	5	1, 2, 4, 5 และ 7
139	4	2, 4, 5 และ 7
139 x 92	4	2, 4, 5 และ 7
140	5	1, 2, 4, 5 และ 7
140 x 92	4	2, 4, 5 และ 7
152	6	1, 2, 3, 4, 5 และ 7
152 x 92	5	2, 3, 4, 5 และ 7
171	6	1, 2, 4, 5, 6 และ 7
171 x 92	4	1, 2, 4 และ 5
195	4	2, 4, 5 และ 7
195 x 92	6	1, 2, 4, 5, 6 และ 7
196	4	2, 4, 5 และ 7
196 x 92	5	1, 2, 4, 5 และ 7

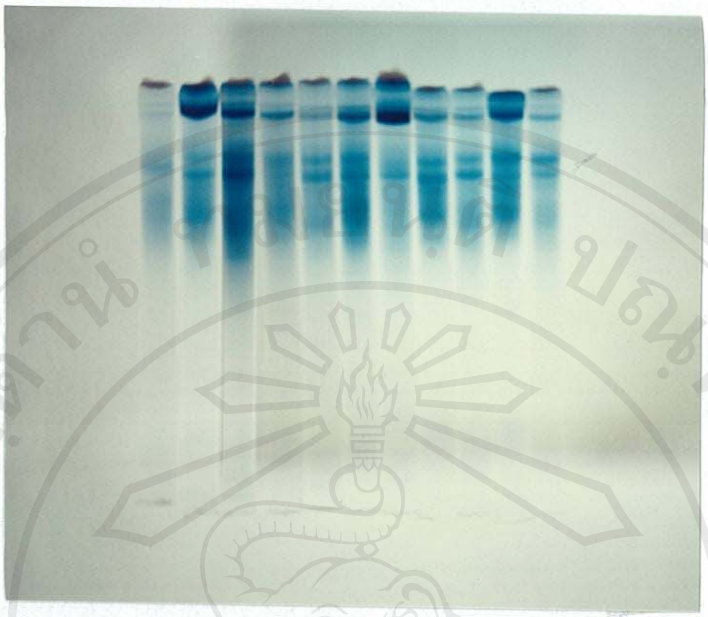
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในเรื่องจำนวนแถบ หมายเลขแถบและขนาดของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นในพริกพันธุ์พ่อ แม่และลูกผสม ตัวอย่างเช่นการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพริกเบอร์ 2 และ 92 พริกทั้ง 2 เบอร์นี้ต่างก็มีจำนวนแถบ 4 แถบเท่ากัน แต่พริกเบอร์ 2 มีแถบที่ 2, 4, 5 และ 7 ในขณะที่พริกเบอร์ 92 มีแถบที่ 1, 2, 4 และ 7 ส่วนลูกผสมจะมีแถบ 5 แถบคือแถบที่ 1, 2, 4, 5 และ 7 แถบที่ปรากฏในลูกผสมนั้นจะเป็นแถบโปรตีนร่วมของพันธุ์พ่อและแม่ ดังจะเห็นได้ว่าพริกลูกผสมเบอร์ 2x92 จะมีแถบที่ 1 ซึ่งไม่พบในต้นแม่ แต่พบในต้นพ่อ และเช่นเดียวกันก็จะรับแถบอื่น ๆ มาจากต้นพ่อหรือแม่ หรืออาจจะมีปฏิกิริยาร่วมในทางบวกของพันธุ์พ่อและแม่ทำให้มีจำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏมากกว่าที่พบในพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ ดังเช่นแถบที่ 5 ที่ปรากฏในลูกผสมเบอร์ 68x92, 69Ex92 และ 70Bx92 การทดลองในครั้งนี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Kim and Park (1984) ที่ว่า มีการผสมผักกาดหัวพันธุ์พ่อที่มียีน MM และมีแถบโปรตีนอันที่ 1 กับพันธุ์แม่ที่มียีน NN และมีแถบโปรตีนอันที่ 2 จะได้ลูกผสมที่ยีนพันธุ์ทาง (heterozygous gene) MN และมีแถบโปรตีนอันที่ 1, 2 และ 3 เกิดขึ้นมาในลูกผสมได้

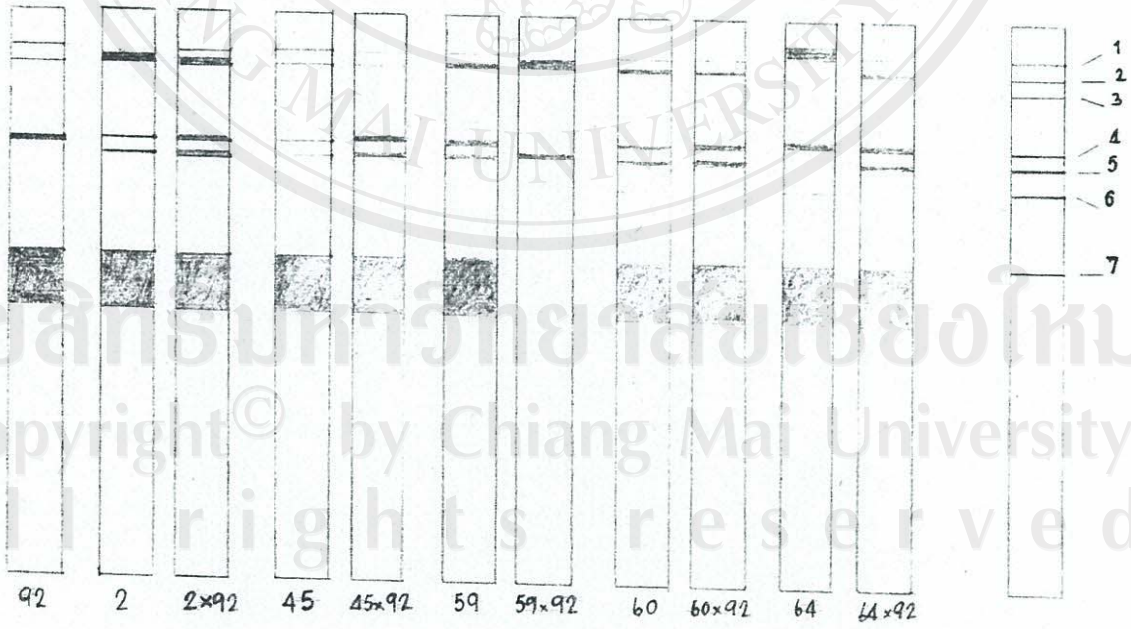
นอกจากนั้นแล้วยังจะมีการขาดหายไปของแถบโปรตีนในลูกผสมได้ ทั้ง ๆ ที่แถบดังกล่าวนั้นพบอยู่ในทั้งพันธุ์พ่อและแม่ดังจะเห็นได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์พ่อเบอร์ 92 กับพันธุ์แม่เบอร์ 67A ที่มีการขาดหายไปของแถบโปรตีนแถบที่ 7 การที่เป็นดังนี้อาจจะเป็นเพราะปฏิกิริยาร่วมที่เกิดขึ้นเป็นไปในทางลบ

ในบางคู่ผสมจะพบได้ว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนและหมายเลขแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นก็ตาม ดังเช่นการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพริกเบอร์ 45 และเบอร์ 92 ลูกผสมที่ได้มีจำนวนแถบ 5 แถบ และหมายเลขแถบเป็น 1, 2, 4, 5 และ 7 เหมือนกันกับต้นแม่เบอร์ 45 ก็ตาม แต่เมื่อพิจารณาถึงขนาดของแถบโปรตีนแล้ว จะเห็นได้ว่าแถบโปรตีนแถบที่ 4 และ 5 ของลูกผสม มีขนาดที่ใหญ่กว่าแถบของต้นแม่ ซึ่งก็ถือเป็นลักษณะที่แสดงถึงความแตกต่างกันได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

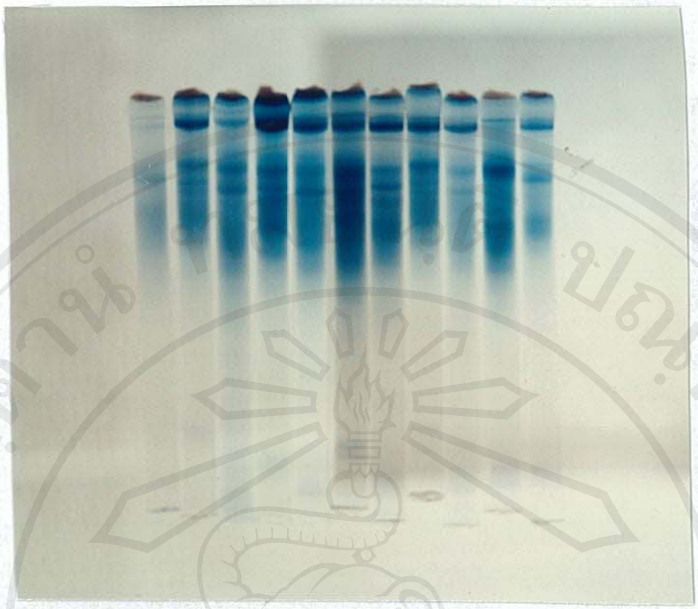


ภาพที่ 23 การเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนโปรตีนที่ปรากฏบน running gel ของพริกเบอร์ 92, 2, 2x92, 45, 45x92, 59, 59x92, 60, 60x92, 64 และ 64x92

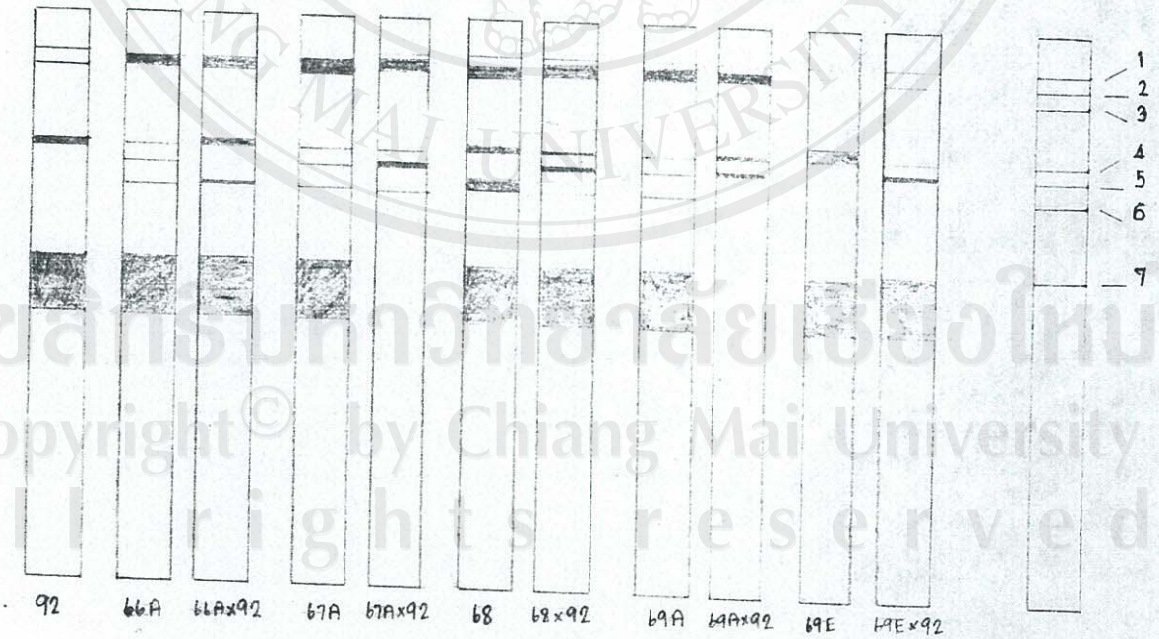


ภาพที่ 24 แบบแผนการเปรียบเทียบลักษณะแถบโปรตีนจากภาพที่ 23 และรูปแบบแผนมาตรฐานรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

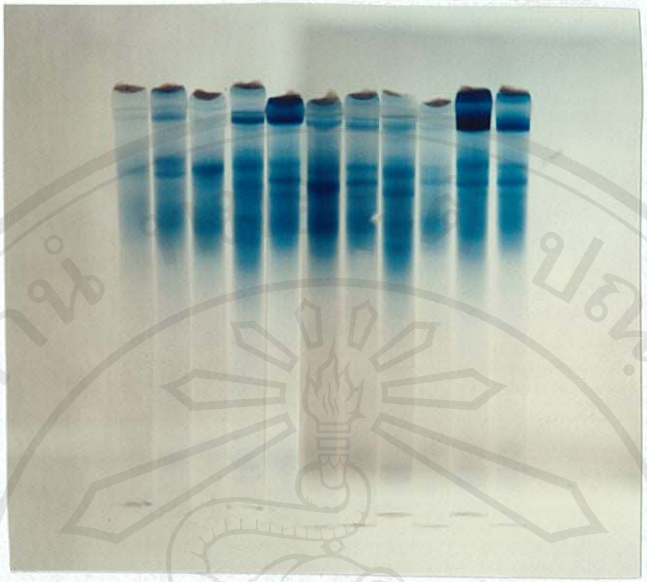


ภาพที่ 25 การเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนโปรตีนที่ปรากฏบน running gel ของพริกเบอร์ 92, 66A, 66Ax92, 67A, 67Ax92, 68, 68x92, 69A, 69Ax92, 69E และ 69Ex92

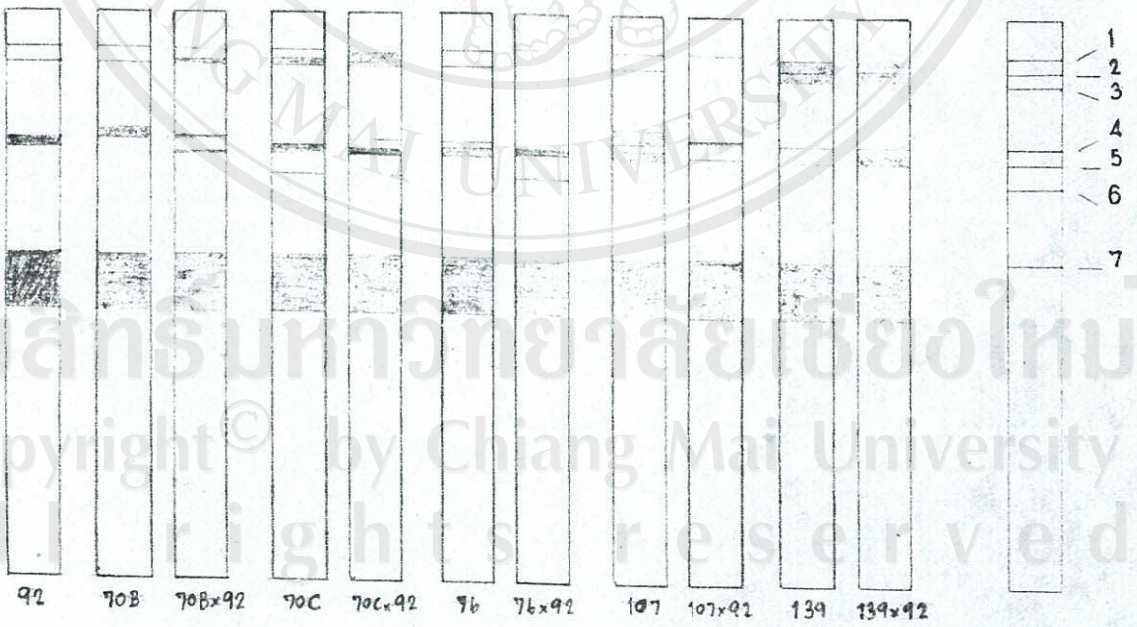


ภาพที่ 26 แบบแผนการเปรียบเทียบลักษณะแถบโปรตีนจากภาพที่ 20 และรูปแบบแผนมาตราฐานรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

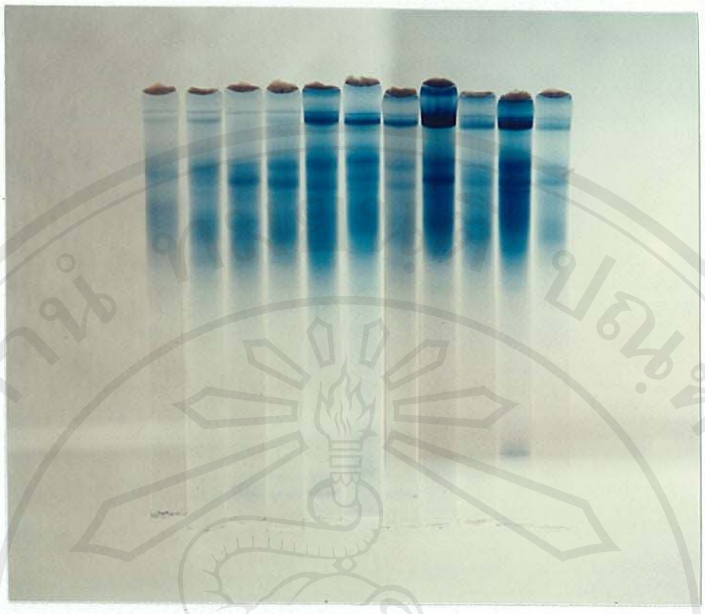


ภาพที่ 27 การเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนโปรตีนที่ปรากฏบน running gel ของพริกเบอร์ 92, 70B, 70Bx92, 70C, 70Cx92, 76, 76x92, 107, 107x92, 139 และ 139x92

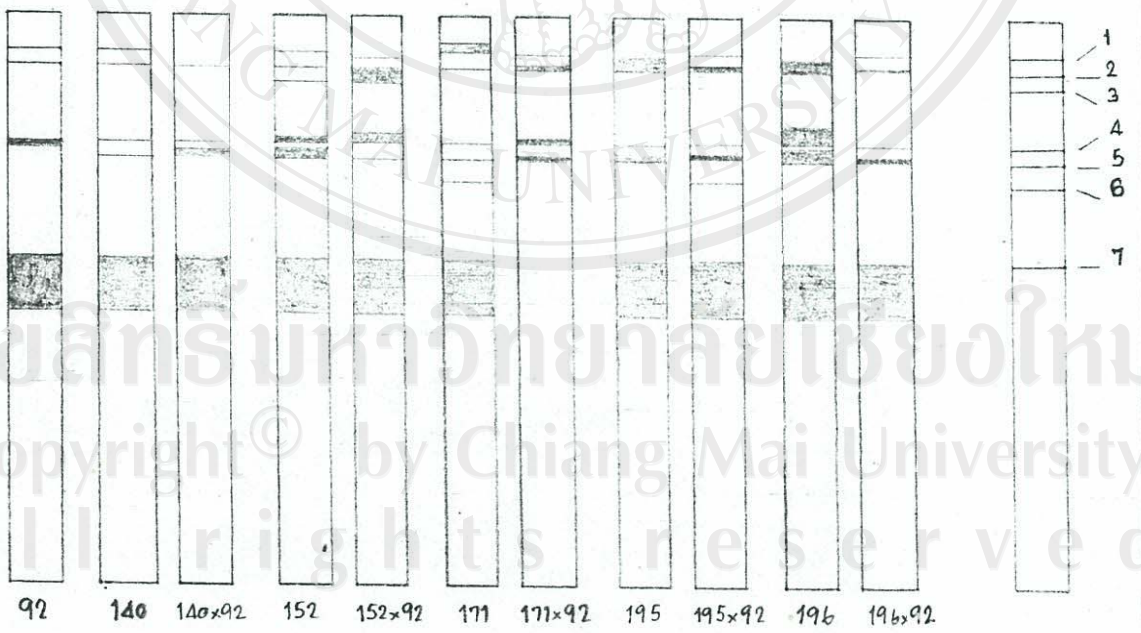


ภาพที่ 28 แบบแผนการเปรียบเทียบลักษณะแถบโปรตีนจากภาพที่ 27 และรูปแบบแผนมาตรฐานรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 29 การเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนโปรตีนที่ปรากฏบน running gel ของพริกเบอร์ 92, 140, 140x92, 152, 152x92, 171, 171x92, 195, 195x92, 196 และ 196x92



ภาพที่ 30 แบบแผนการเปรียบเทียบลักษณะแถบโปรตีนจากภาพที่ 29 และรูปแบบแผนมาตรฐานรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.2 แบบแผนโปรตีนของพริกผสมข้ามชนิด

จากการศึกษาแบบแผนการเคลื่อนที่ของโปรตีน (ตารางที่ 9) ที่ปรากฏใน running gel ของพริกพันธุ์พ่อ แม่และลูกผสมข้ามชนิดทั้งหมด พบว่ามีการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่แยกออกได้ชัดเจนทั้งหมดไม่เกิน 6 แถบด้วยกัน แถบที่หนึ่งเป็นแถบโปรตีนที่มีการเคลื่อนตัวออกห่างจากจุดเริ่มต้น (ขั้วลบ) ประมาณ 0.5 เซนติเมตร แถบที่สองมีระยะการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 0.7 เซนติเมตร แถบที่สามมีระยะการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 1.7 เซนติเมตร แถบที่สี่มีระยะการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 1.9 เซนติเมตรแถบที่ห้ามีระยะการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 2.2 เซนติเมตร และแถบที่หกมีระยะการเคลื่อนตัวห่างประมาณ 3.2 เซนติเมตร

ตารางที่ 9 จำนวนแถบและหมายเลขแถบโปรตีนที่เกิดบนแห่งเจลของพริก 7 เบอร์

เบอร์พริก	จำนวนแถบที่เกิดขึ้น	หมายเลขแถบ
67A	5	2, 3, 4, 5 และ 6
127	5	1, 2, 4, 5 และ 6
143	4	1, 2, 3 และ 4
67A x 127	5	1, 2, 3, 4 และ 6
67A x 143	4	2, 3, 4 และ 6
127 x 143	5	2, 3, 4, 5 และ 6
143 x 127	4	2, 3, 5 และ 6

จากตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในส่วนของจำนวน หมายเลขแถบและขนาดของแถบโปรตีน ของพันธุ์พ่อ แม่และลูกผสมที่เกิดจากการผสมโดยตรงหรือผสมกลับเพศ (reciprocal cross) ก็ตาม ดังจะเห็นได้จากการผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

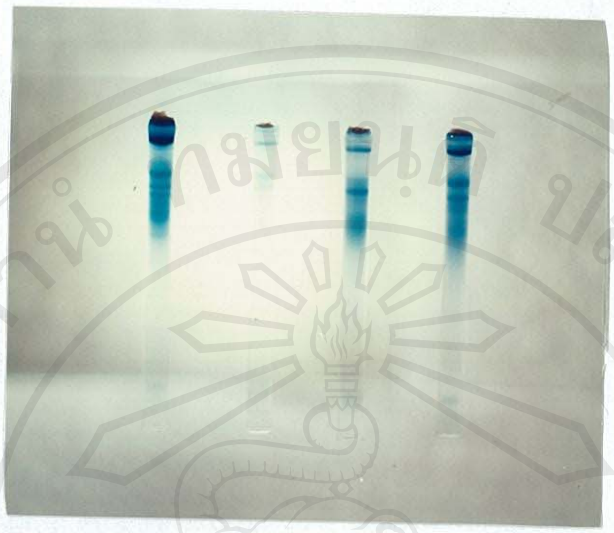
ข้ามชนิดที่ใช้พริกเบอร์ 67A (C. annuum) เป็นต้นแม่ มีจำนวนแถบโปรตีน 5 แถบ คือ แถบที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 เบอร์ 127 (C. chinense) เป็นต้นพ่อมีแถบโปรตีน 5 แถบคือ 1, 2, 4, 5และ 6 และในลูกผสมข้ามระหว่างชนิดโดยตรง 67Ax127 จะมีแถบโปรตีน 5 แถบคือ 1,2,3,4 และ 6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าลูกผสมได้รับแถบโปรตีนส่วนเกินแถบที่ 1 มาจากต้นพ่อ แถบที่ 5 มาจากต้นแม่ มีแถบโปรตีนร่วมระหว่างพันธุ์พ่อและแม่คือแถบที่ 2, 3, 4 และมีการสูญหายไปของแถบที่ 5

เช่นเดียวกันในลูกผสมข้ามระหว่างชนิด 67Ax143 ได้รับแถบโปรตีนส่วนเกินแถบที่ 6 มาจากพันธุ์แม่ และมีแถบโปรตีนร่วมของพันธุ์พ่อและแม่คือ แถบที่ 2, 3 และ 4

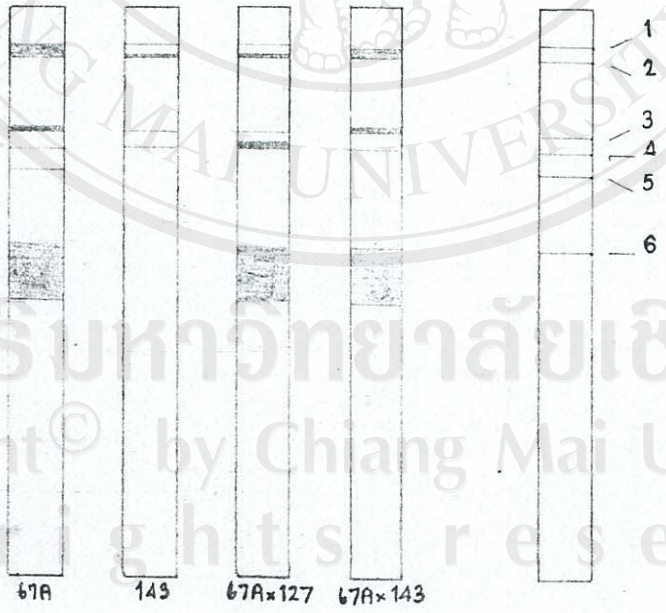
ในการผสมข้ามระหว่างชนิดของคู่ผสมเบอร์ 127 (C. chinense) และ 143 (C. baccatum) ก็ปรากฏผลของแถบโปรตีนในทำนองเดียวกันกับคู่ผสมระหว่างเบอร์ 67A และ127 จะมีข้อแตกต่างของผลการทดลองตรงที่มีการสูญหายไปของแถบโปรตีนแถบที่ 1 ของพันธุ์พ่อ-แม่ที่ควรจะมีในลูกผสม ไม่ว่าเป็นการผสมโดยตรงหรือผสมกลับเพศก็เช่นกัน ทั้งนี้อาจจะเกิดเนื่องมาจากปฏิกิริยาร่วมในทางลบของพันธุ์พ่อและแม่ก็ได้

นอกจากนั้นแล้วการทดลองในครั้งนี้ก็ยังบอกถึงความแตกต่างของลูกผสมโดยตรงและลูกผสมกลับเพศได้ โดยใช้จำนวน หมายเลขและขนาดของแถบโปรตีนเป็นเกณฑ์บอก ดังจะเห็นได้จากทั้งในคู่ผสมของ 67Ax127 และ 67Ax143 หรือ 127x143 และ 143x127 ในลูกผสมเบอร์ 67Ax127 จะมีจำนวนแถบโปรตีน 5 แถบ คือ 1, 2, 3, 4 และ 6 ในขณะที่ลูกผสม 67Ax143 มีจำนวนแถบโปรตีนเพียง 4 แถบคือ 2, 3, 4 และ 6 เท่านั้น และเช่นเดียวกันในลูกผสม 127x143 มีจำนวนแถบโปรตีน 5 แถบคือ 2, 3, 4, 5 และ 6 ในขณะที่ลูกผสมกลับเพศ 143x127 มีจำนวนแถบโปรตีนเพียง 4 แถบคือ 2, 3, 5 และ 6 เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

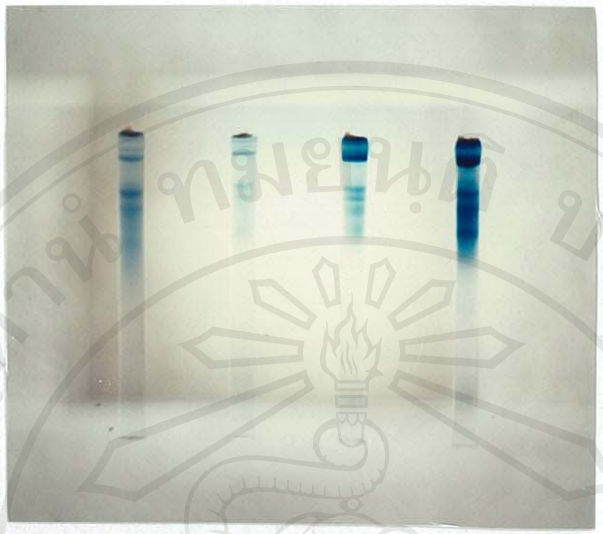


ภาพที่ 31 การเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนโปรตีนที่ปรากฏบน running gel ของพริกเบอร์ 67A, 143, 67Ax127 และ 67Ax143

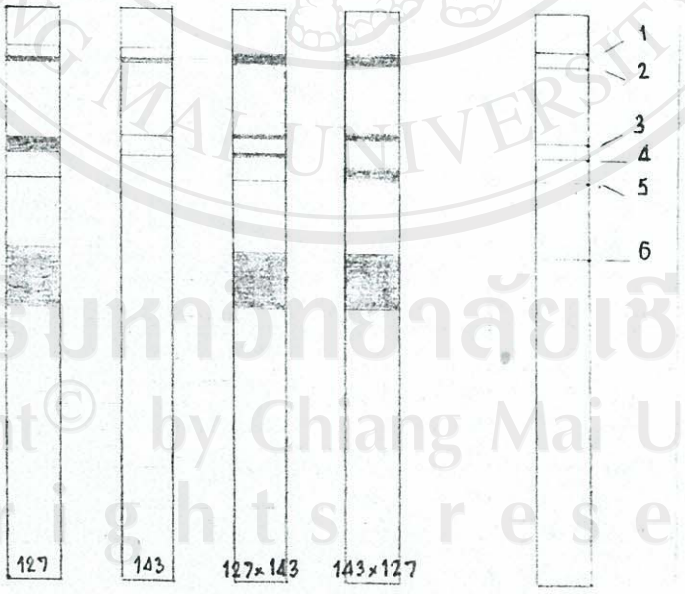


ภาพที่ 32 แบบแผนการเปรียบเทียบลักษณะแถบโปรตีนจากภาพ 31 และรูปแบบแผนมาตรฐานรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 33 การเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนโปรตีนที่ปรากฏบน running gel ของพริกเบอร์ 127, 143, 127x143 และ 143x127



ภาพที่ 34 แบบแผนการเปรียบเทียบลักษณะแถบโปรตีนจากภาพที่ 33 และรูปแบบแผนมาตรฐานรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

7.1 แบบแผนโปรตีนของพริกผสมข้ามพันธุ์

การทดลองในครั้งนี้สามารถศึกษาถึงแบบแผนการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีน (ตารางที่ 8) แต่ละชนิดของพริกได้ โดยการใช้ amido black เป็นสีย้อมโปรตีนที่เคลื่อนที่อยู่ภายในแท่งเจล พริกที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้จำนวน 41 เบอร์มีการเคลื่อนที่ของโปรตีนไปในแท่งเจล และแยกตัวออกมาเป็นแถบชัดเจนได้ไม่เกิน 7 แถบ ในพริกแต่ละพันธุ์ก็จะมีจำนวนแถบ หมายเลขแถบและขนาดของแถบโปรตีนปรากฏออกมาในลักษณะที่แตกต่างกัน จำนวนแถบที่ต่ำสุดพบได้ในพริกเบอร์ 59x92 มีเพียง 2 แถบเท่านั้น ส่วนพริกที่มีจำนวนแถบสูงสุดจะพบได้ในพริกเบอร์ 60,68x92,69A,152,171 และ 195x92 ซึ่งมีมากถึง 6 แถบส่วนหมายเลขแถบโปรตีนที่ปรากฏในพริกแต่ละเบอร์ก็มีทั้งที่แตกต่างกันและซ้ำกัน เมื่อหมายเลขแถบโปรตีนของพริกแต่ละเบอร์ซ้ำกัน ต้องมีการพิจารณาขนาดของแถบโปรตีนเป็นองค์ประกอบในการบ่งบอกถึงความแตกต่างกันด้วย

จากการทดลองในครั้งนี้สามารถใช้ลักษณะของแบบแผนการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ได้จากขบวนการ electrophoresis เป็นเกณฑ์ในการจำแนกความแตกต่างของพันธุ์พริกได้อีกวิธีหนึ่ง นอกเหนือจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ในการจำแนก แต่อย่างไรก็ตามขบวนการอิเลคโตรโฟรีซิสที่ใช้ amido black เป็นสีย้อมโปรตีนนั้นก็ยังมีข้อบกพร่องอยู่บ้าง เพราะสีย้อมชนิดนี้จะจับกับโปรตีนทุก ๆ ชนิดที่เคลื่อนที่อยู่ในแท่งเจลนั้น ซึ่งอาจเป็นผลให้มีการแยกแถบโปรตีนไม่ชัดเจนในกรณีที่โปรตีนเหล่านั้นมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน แถบโปรตีนที่ถูกย้อมสีจะเป็นแท่งทึบติดต่อกันไป หรือในกรณีที่พืชมีโปรตีนมากชนิด แถบโปรตีนที่ย้อมสีได้ก็จะเกิดได้มากมาย ทำให้ยากต่อการเปรียบเทียบถึงความแตกต่าง ด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้ในปัจจุบันจึงนิยมใช้สีย้อมเพื่อย้อมโปรตีนเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น เพื่อให้ได้แบบแผนการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีการแยกแถบอย่างชัดเจนและมีจำนวนแถบเพียงไม่กี่แถบ ง่ายต่อการเปรียบเทียบถึงความแตกต่างของพืชแต่ละพันธุ์ได้ แต่อย่างไรก็ดีการทดลองในครั้งนี้ได้ใช้พันธุ์พริกที่นำมาจากแหล่งปลูกที่แตกต่างกัน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต่างกันมาก จึงประสบกับปัญหาดังกล่าวน้อย และสามารถใช้แบบแผนการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เคลื่อนที่ของโปรตีนที่ได้จากการย้อมสี amido black เป็นเกณฑ์ในการจำแนกถึงความแตกต่างของพริกบางพันธุ์ได้

7.2 แบบแผนโปรตีนของพริกผสมข้ามชนิด

การทดลองในครั้งนี้ (ตารางที่ 9) สามารถศึกษาถึงแบบแผนการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนทั้งหมดในพริกแต่ละชนิดได้ โดยการใช้ amido black เป็นสีย้อมโปรตีนเช่นเดียวกันกับการศึกษาในพริกที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ ซึ่งพบว่าการศึกษาพันธุ์พริกเพื่อการผสมข้ามระหว่างชนิดจำนวน 7 เบอร์จะมีการเคลื่อนที่ของโปรตีนไปในแห่งเจลและแยกตัวออกมาเป็นแถบชัดเจนได้ไม่เกิน 6 แถบ เมื่อเปรียบเทียบถึงความแตกต่างของแบบแผนการเคลื่อนที่ฯ แล้ว ก็พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งในเรื่องจำนวน หมายเลขแถบและขนาดของแถบโปรตีนในพริกทั้ง 7 เบอร์ โดยที่พริกเบอร์ 143, 67Ax143, และ 143x127 มีจำนวนแถบโปรตีนเพียง 4 แถบ ส่วนพริกเบอร์ 67A, 127, 67Ax127 และ 127x143 จะมีจำนวนแถบโปรตีน 5 แถบ นอกจากนั้นแล้วในพริกแต่ละเบอร์ก็ยังมีความแตกต่างในเรื่องหมายเลขแถบและขนาดของแถบโปรตีนด้วย ดังนั้นโดยหลักเกณฑ์เดียวกันกับการจำแนกความแตกต่างของพริกที่ต่างพันธุ์กัน ก็สามารถนำมาใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดของพริกได้

และจากการทดลองในครั้งนี้จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างของแบบแผนการเคลื่อนที่ของโปรตีนของพริกผสมข้ามชนิด ทั้งในคู่ผสมของพริกเบอร์ 67Ax127 (C. annuum x C. chinense) และ 67Ax143 (C. annuum x C. baccatum) หรือ 127x143 (C. chinense x C. baccatum) และ 143x127 (C. baccatum x C. chinense) ทั้งๆ ที่โดยทั่วไปแล้วลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพริกที่ได้จากการผสมโดยตรงและการผสมกลับเพศมักไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการใช้แบบแผนการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากขบวนการอีเลคโตรโฟรีซีสในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และชนิด จะมีความละเอียดและแม่นยำมากกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ในการจำแนก ซึ่งการทดลองในครั้งนี้จะตรงกับรายงานของเพิ่มพงษ์ (2530) ที่อ้างถึงรายงานของ Larsen ค.ศ. 1969 ที่ว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พืชแสดงออกมาใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ธรรมชาติ และเห็นความแตกต่างในระหว่างสายพันธุ์นั้นจะมีความแตกต่างกันในทางชีวเคมี แต่ความแตกต่างทางชีวเคมีทั้งหมดไม่จำเป็นว่าพืชนั้นมีลักษณะแตกต่างกันในทางสัณฐานวิทยาในทุกกรณีไป แสดงว่าความแตกต่างทางเคมีและชีวเคมีจะมีมากกว่าความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved