สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชาพืชสวน
เรื่อง
การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวประดับ
Studies of Isozyme Patterns in Water-lily

โดย
นางสาวอรวรรณ ช้างพันธ์

ได้รับการเห็นชอบจาก

.....
(อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(ผศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ)
หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

วันที่ 21 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 43

ปพ.
ข 37ลก
2543
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 35913
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวประดับ

Studies of Isozyme Patterns in Water-lily

โดย

นางสาวอรวรรณ ช้างพันธ์

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวประดับ

Studies of Isozyme Patterns in Water-lily

โดย นาวสาวอรวรรณ ช้างพันธ์

ภาควิชา พืชสวน **สาขา** พืชสวน

คณะ เทคโนโลยีการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การศึกษาไอโซไซม์ในบัวประดับจำนวน 5 พันธุ์คือ บัวฝรั่ง บัวผันนางกวักสีน้ำเงินคราม บัวสายชมพูซิลอน บัวผันงอกต้นบนใบ และ บัวผันยงลาภ ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซีส ชิ้นส่วนของบัวประดับที่ใช้ คือ ก้านอ่อนและใบอ่อน สารสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) ที่เหมาะสม คือ 0.5 M Tris pH 7.0 , 100mM EDTA , 1 M $MgCl_2$, 1M KCl , 10% PVP และ 0.1% beta-mercaptoethanal จากการวิเคราะห์ไอโซไซม์ 6 ระบบ ผลปรากฏว่าสามารถตรวจจับ Activity ของเอนไซม์ได้ 2 ระบบ คือ Esterases (EST) และ Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT) ในการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์บัวทั้ง 5 พันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Studies of Isozyme Patterns in Water-lily

By Miss Orawan Changpan

Department Horticulture

Faculty Agriculture Technology

Advisor Miss Kanjana Saetiew

Abstract

Studies of isozyme patterns of 5 water-lily cultivars : day lily , blue nang kwak , chomphusilon , dauben and yonglarp were investigated by using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).The best plant organs were young leaf and young petiale.The best extraction buffer was 0.5 M Tris pH 7.0 , 100mM EDTA , 1 M $MgCl_2$, 1M KCl , 10% PVP and 0.1% beta-mercaptoethanal.Six enzyme systems were examined , only 2 enzyme systems showed the distinction bands were achieved from esterases (EST) , glutamic oxaloacetic transaminase (GOT).Both enzyme systems could be used to distinguish water-lily cultivars.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยความกรุณาแนะนำของอาจารย์ภัญจนา แซ่เตียว อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่ช่วยแนะนำให้ข้อคิด ตลอดจนแก้ไขปัญหาต่างๆ ตั้งแต่เริ่มแรกจนเสร็จเรียบร้อยสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เสริมลาภ วสุวัต ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์บัว และวิธีการปลูกบัวที่ถูกต้อง ขอขอบพระคุณอาจารย์เนาวรัตน์ ปานแย้ม หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ และ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องcentrifuge ใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาพืชสวน ที่ให้เบิกอุปกรณ์นำมาใช้ในการทำการทดลอง รวมทั้งขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่เป็นกำลังใจ และให้การช่วยเหลือในการทำงานโดยตลอด

ขอขอบคุณภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การศึกษา และสถานที่ในการปฏิบัติงาน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ ทุกคนในครอบครัว พ่อ แม่ และพี่สาวทั้งสองคน ที่คอยให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

นางสาวอรวรรณ ช้างพันธ์

มีนาคม 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญภาพ	(ก)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	14
- อุปกรณ์	
- วิธีการ	
วันและสถานที่ทำการทดลอง	25
ผลการทดลอง	26
วิจารณ์ผลการทดลอง	36
สรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	บัวผันยงลาภ	16
ภาพที่ 2 (a)	บัวสายชมพูซิลอน	17
(b)	บัวผันนางกวักสีน้ำเงินคราม	
ภาพที่ 3 (a)	บัวฝรั่ง	18
(b)	บัวผันงอกต้นบนใบ	
ภาพที่ 4	การแสดงออกของเอนไซม์ EST ที่ใช้เปรียบเทียบสารสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสม 5 ชนิด	29
ภาพที่ 5	รูปแบบ Zymogram ของ สารสกัดเอนไซม์ 5 ชนิด	29
ภาพที่ 6	รูปแบบ Isozyme Esterases ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 3	30
ภาพที่ 7	รูปแบบ Zymogram ของ Isozyme Esterases ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 3	31
ภาพที่ 8	รูปแบบ Isozyme Glutamic Oxaloacetic Transaminase ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5	32
ภาพที่ 9	รูปแบบ Zymogram ของ Isozyme Glutamic Oxaloacetic Transaminase ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5	33
ภาพที่ 10	รูปแบบ Isozyme Esterases ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5	34
ภาพที่ 11	รูปแบบ Zymogram ของ Isozyme Esterases ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปัจจุบันประชาชนเริ่มให้ความสนใจ ใช้ประโยชน์ในการปลูกบัวเป็นไม้ดอกไม้ประดับมากขึ้น ที่จะเห็นได้มากได้แก่บัวหลวงประเภทที่ซ้อนมาก เช่น บัวสัตตบงกช หรือพันธุ์ดอกเล็กสีชมพู ที่เรียกว่าบัวจีน หรือ บัวไต้หวัน แต่บัวหลวงก็ยังเป็นบัวที่ต้องใช้พื้นที่ปลูกมาก ที่นิยมมากที่สุดในเวลานี้มีจำหน่ายมากมายในตลาดก็คือ บัวผัน บัวเผื่อน และบัวสาย (พานิชย์ , 2540) รวมไปถึงบัวฝรั่ง ซึ่งรวมเรียกว่าอุบลชาติ และลักษณะเด่นของอุบลชาติ คือ มีหลากหลายสี

อุบลชาติยืนต้นหรือพวกบัวฝรั่ง มี 5 สี คือ ขาว ชมพู แดง เหลือง และส้มอมแสด อุบลชาติส้มลุกบานกลางวัน โดยเฉพาะพวกบัวผัน บัวเผื่อน มีเกือบทุกสี ยกเว้นสีดำ อุบลชาติส้มลุกบานกลางคืนหรือพวกบัวสาย มีเพียงสามสี คือ ขาว ชมพู และแดง อย่างไรก็ตาม มักจะพบว่า บัวพันธุ์เดียวกัน ปลูกต่างที่กัน สีจะต่างกัน จึงทำให้คิดว่าเป็นคนละพันธุ์ ปัจจัยที่มีผลต่อสีของดอกบัว ได้แก่ สภาพแวดล้อม แสงแดด อุณหภูมิ สภาพการปลูก ความอุดมสมบูรณ์ของต้นบัว และปุ๋ยที่ใช้ (เสริมลาภ , 2538) และพันธุ์บัวประเภทอุบลชาติทุกพันธุ์ อยู่ในสกุลเดียวกัน คือ*Nymphaeae* ซึ่งก็ไม่สามารถรู้ได้ว่าในแต่ละพันธุ์นั้นจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน หรือแตกต่างกัน

ดังนั้นจึงมีการใช้ Biochemical marker เช่น Isozyme restriction fragment length polymorphism โดยการใช้เทคนิคของ electrophoresis พบว่าสามารถแยกพันธุ์พืชได้ ข้อดีของการจำแนกพันธุ์โดยวิธีนี้คือ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และให้ผลในเวลาอันรวดเร็ว (สุภาพ และคณะ , 2540) สารค้ำจุนที่ใช้กันมาก คือ starch gel electrophoresis (SGE) , polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) , agarose gel และcellulose acetate membranes แต่สารที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Powell , 1992)

การศึกษาเรื่องนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อมีการนำเทคนิคทาง electrophoresis โดยใช้ polyacrylamide gel ในการจำแนกพันธุ์รวมถึงได้ข้อมูลทางชีวเคมีเพื่อเสริมงานด้านอนุกรมวิธานให้มีค่ามากขึ้น นอกจากนี้ยังนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านปรับปรุงพันธุ์ ส่งผลให้งานทางด้านปรับปรุงพันธุ์พืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น (ปนัดดา และ เกศินี , 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของบัวในกลุ่ม *Nymphaea* บางชนิด
2. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านอนุกรมวิธาน และงานทางด้านปรับปรุงพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

บัวจัดอยู่ในวงศ์ (family) นิมเฟียซีอี (*Nymphaeaceae*) แยกเป็น 3 สกุล (genus) เรียบเรียงตามแบบพฤกษศาสตร์ จะได้ดังนี้

วงศ์	นิมเฟียซีอี (*Nymphaeaceae*)	บัว
สกุล	นีลัมโบ (*Nelumbo*) ใบชูเหนือน้ำ	บัวหลวง
สกุล	นิมเฟีย (*Nymphaea*) ใบลอยแตะผิวน้ำไม่มีหนาม	บัวผัน บัวเผื่อน บัวฝรั่ง บัวสาย
สกุล	วิกตอเรีย(*Victoria*) ใบลอยแตะผิวน้ำ ใบใหญ่ มีหนาม	บัวกระด้ง

แต่ละสกุลแยกออกเป็นอีกหลายชนิดหรือหลายพรรณ (Species) แต่ละชนิดหรือพรรณก็แยกออกไปอีกหลายพันธุ์ (Variety) ทั้งพันธุ์แท้และลูกผสม (Hybrid) (พานิชย์ , 2540)

อุบลชาติ (water lily) อยู่ในสกุล *Nymphaea* มีเหง้าใต้ดิน ใบลอยแตะผิวน้ำ รูปร่างใบมีหลายแบบ ไม่มีหนาม ดอกบานได้นาน 3-4 วัน กลีบดอกซ้อน แบ่งได้เป็น 2 ชนิด

อุบลชาติยืนต้น (Castalia group , Hardy type , Hardy water-lily) มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่นและเขตหนาว เรียกว่า บัวฝรั่ง มีเหง้าเลื้อยไปตามผิวดิน แตกหน่อหรือหัวได้ และพักตัวในฤดูหนาว ขอบใบเรียบ ดอกมี 5 สี คือ ขาว ชมพู แดง เหลือง ส้ม ดอกลอยแตะผิวน้ำ บานตอนเช้าหุบตอนเย็น มักไม่มีกลิ่นหอม ติดเมล็ดยาก

อุบลชาติล้มลุก (Lotus group , Tropical type , Tropical water-lily) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน ไม่พักตัวในฤดูหนาว แต่จะให้ดอกน้อยลง (ถ้าปลูกในเขตหนาว จะตายในฤดูหนาว) มีเหง้าเจริญเติบโตในแนวดิ่ง ดอกมีหลายสี ชูขึ้นเหนือผิวน้ำ บานนาน 3-4 วัน ขอบใบจักมน หรือแหลม แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

1. บัวผันและบัวเผื่อน ดอกบานตอนเช้า หุบตอนเย็น กลิ่นหอมมาก ก้านใบและก้านดอกไม่มีขน
2. บัวสาย ดอกมี 3 สี คือ ขาว ชมพู และบานเย็นถึงแดง บานตอนใกล้ค่ำ และหุบในตอนเช้าของวันรุ่งขึ้น ไม่มีกลิ่นหอม แต่บางชนิดมีกลิ่นหอมอ่อนๆ
3. จงกลนี ปัจจุบันมีเพียงชนิดเดียว ใบและดอกลอยแตะผิวน้ำ ดอกบานตลอดเวลาไม่มีกลิ่นหอม (อุไร , 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและการแสดงออกของยีนในพืชต่างๆนั้น โดยปกติมักจะตรวจสอบได้จากคุณสมบัติทั้งทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมี โดยเฉพาะคุณสมบัติทางชีวเคมีนั้นดูเหมือนว่าจะมีความสำคัญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพราะสามารถแสดงผลการทดลองที่ให้ข้อมูลออกมามีปัจจัยเนื่องจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าลักษณะที่แสดงออกให้เห็นในทางสัณฐานวิทยา จึงจะเห็นได้ว่าปัจจุบันการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีจึงได้มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในงานวิจัยทางด้านพืชศาสตร์ (เพิ่มพงษ์ และคณะ , 2532)

Isozyme คือ เอนไซม์ชนิดเดียวกันที่มี gene ต้นแบบมากกว่าหนึ่ง gene ทำให้มีโมเลกุลที่ต่างกัน (เนื่องจากการเรียงตัวของ subunits ที่ต่างกัน) หรือเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่ต่างรูป ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีองค์ประกอบที่ต่างกัน คุณสมบัติทางไฟฟ้าและโครงสร้างจะต่างกัน แต่มีปฏิกิริยาทางเคมีแบบเดียวกัน เอนไซม์ต่างๆ สามารถสกัดได้จากส่วนต่างๆ ของพืช โดยอาศัยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ซึ่งสามารถศึกษาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกอพันธุ์ (clone) ของพืชชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกัน หรือจำแนกพันธุ์พืชได้จากแบบของไอโซไซม์ (isozyme pattern) ทั้งนี้เอนไซม์หลายชนิดที่อยู่สร้างขึ้นแล้วอาจเกิดขบวนการทางเคมีบางอย่างเช่น methylation หรือ phosphorylation ทำให้เอนไซม์ถูกเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะ side chain ของกรดอะมิโนในโมเลกุลของเอนไซม์ระหว่างการเจริญเติบโตหรือขบวนการต่างๆ ทางชีวเคมีได้ (ชวนพิศ , 2538) ปัจจุบันงานตรวจสอบโดยการใช้วิธีอิเลคโตรโฟรีซิสกำลังเป็นที่นิยมเพราะทำได้ไม่ยากสะดวกรวดเร็วและให้ผลที่ไม่เบี่ยงเบน (เสาวณี , 2538) การใช้เทคนิคทางไอโซไซม์สามารถนำมาศึกษา วิจัย ความสัมพันธ์ของระดับโมเลกุล ลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ แสดง polymorphic loci ในแต่ละประชากร metabolismของพืชแต่ละชนิด ความสัมพันธ์ของ nucleo-cytoplasmic (Scandalios and Sorenson ,1977)

Electrophoresis หรือ Zone electrophoresis คือ เทคนิคอิเล็คโทรโฟรีซิส ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน สำหรับแยกสารตัวอย่างให้มีความบริสุทธิ์ ตรวจวิเคราะห์สารผสมโดยเฉพาะเอนไซม์และโปรตีนเพื่อการจำแนกสายพันธุ์พืช หลักการโดยทั่วไปคือ การหยดสารตัวอย่างลงใน สารตัวกลางกึ่งแข็ง เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าลงในตัวกลางซึ่งแช่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ โมเลกุลของสารตัวอย่างที่สกัดแล้วจะเคลื่อนที่บนตัวกลางดังกล่าว ตามชนิด ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลสาร เกิดเป็นแถบ (band หรือzone) สารตัวกลางที่ใช้เป็นสารช่วยลดการรบกวนจากสภาพภายนอกแก่สารตัวอย่างได้

Gel electrophoresis เป็นแบบที่มีสารตัวกลางจำพวกเจลหรือสารกึ่งแข็ง ได้แก่ แป้ง (starch) อะกาโรส (agarose) โพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมระหว่าง acrylamide กับ N,N – methylenebisacrylamide (cross linking) การแยกของโมเลกุลสารจะอาศัยสภาพของเนื้อเจล และขนาดช่องของเนื้อเจล (pore size) ที่เตรียมให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยทั่วไปความเข้มข้นของเจลจะอยู่ระหว่าง 2-20% ในอดีต gel electrophoresis ที่นำมาใช้ในงานไอโซไซม์ส่วนใหญ่เป็น starch gel ซึ่งเหมาะสมในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ แต่บางครั้งขนาดของตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเอนไซม์มีจำกัด ทำให้ผลที่ได้ไม่ชัดเจน จึงทำให้มีการนำ polyacrylamide gel มาแทนที่ เนื่องจากสามารถคุมขนาดของช่องเนื้อเจลได้โดยกำหนดความเข้มข้นของเจล นอกจากจะให้ประสิทธิภาพในด้านการแยกโปรตีนแล้วยังสามารถใช้กับโมเลกุลขนาดเล็กอย่าง RNA และชิ้นส่วนของ DNA

สำหรับการเตรียมเจลทำได้ทั้งในรูป คอลัมน์ (column gel) เจลแผ่น (slab gel) จัดเป็นระบบอิเลคโตรโฟรีซิสในแนวดิ่ง (vertical type) ซึ่งเหมาะสมกับการแยกเอนไซม์และโปรตีนของสารตัวอย่าง ส่วนระบบอิเลคโตรโฟรีซิสในแนวราบ (horizontal type) มักเป็นเจลแบบแผ่น นิยมใช้แยก DNA , RNA หรือกรดนิวคลีอิก

Disc electrophoresis ถือได้ว่าเป็นเทคนิค zone electrophoresis ที่ใช้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์และจำแนกชนิดของโปรตีนที่ปะปนกันอยู่ได้อย่างละเอียด ทำให้ผลของแถบสีได้คมชัดที่สุด คำว่า disc หมายถึง ระบบอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH discontinuity และ voltage discontinuity หลักการของระบบนี้เป็นการเตรียมเจลในรูปของคอลัมน์แนวดิ่ง (vertical column) หรือเป็นแผ่น(slab) โดยจะแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ชั้นตัวอย่าง (sample gel or sample) อยู่บนสุด รองลงมาคือ stacking gel หรือ spacer gel ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเจลต่ำ (3 – 5%) ส่วนชั้นล่างสุด เรียกว่า separating gel หรือ running gel ซึ่งมีความเข้มข้นของเจลสูงขึ้น (7.5 – 12.5%) ชั้นบนและชั้นล่างจะมีขนาดช่องของเนื้อเจล (pore size) ใหญ่กว่า ชั้นล่างสุด เนื่องจากการผสมของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำกว่า ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างที่หยอดในช่องเจลเคลื่อนที่ได้เร็ว สนามไฟฟ้าที่มีแรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงสามารถผลักตัวเองให้เคลื่อนที่ได้เร็วในบริเวณ stacking gel ตัวอย่างสามารถรวมอยู่ระหว่างรอยต่อของ stacking gel และ separating gel ได้มาก การเคลื่อนที่โมเลกุลในส่วนของ separating gel จะช้าลง เนื่องจากขนาดช่องของเนื้อเจลมีขนาดเล็กลง ทำให้สามารถแยกความบริสุทธิ์ของโปรตีนและเอนไซม์เป็นแถบๆ เมื่อทำปฏิกิริยาสีย้อมจึงเห็นเป็นแถบสีที่คมชัดต่อไป (ชวนพิศ , 2538 ; Reiner , 1993)

อิเลคโตรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (Polyacrylamide Gel Electrophoresis , PAGE) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารละลายโปรตีนผสม เป็นเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิสที่มีตัวกลางค้ำจุนเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งเฉื่อยต่อสารเคมีในระหว่างเกิดกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยก ซึ่งเทคนิค PAGE ขนาดรูพรุนของเจลที่เหมาะสมมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดใหญ่ช้าลงกว่า การเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดเล็กกว่า ทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกกันได้ (อาภัสสรา , 2537)

การวิเคราะห์สายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ประสบความสำเร็จสูงทั้งนี้เนื่องจากพืชชนิดหนึ่งนั้นจะแสดงไอโซไซม์หลายรูปแบบ แต่ในสายพันธุ์เดียวกันจะแสดงรูปแบบเฉพาะตัว มีพืชหลายชนิดที่ได้รับการแยกสายพันธุ์โดยวิธีไอโซไซม์และประสบความสำเร็จ (ชุติมา , 2538) สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการและผลที่ตรวจสอบมาได้ค่อนข้างที่จะมีความแม่นยำ Weeden and Lamb (1985) ได้ทำการทดลองกับแอปเปิล 54 ชนิด จาก germplasm NYSAES ใน Geneva , N.Y. โดยนำเทคนิค starch gel electrophoresis มาทำการทดลอง เอนไซม์ที่นำมาทดลองมีทั้งหมด 6 ชนิด แต่มีเพียงสองชนิดที่สามารถบอกลักษณะความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ คือ 6 phosphoglucomate dehydrogenase และ aspartate aminotransferase แต่ถึงอย่างไรก็ไม่สามารถบอกลักษณะต้นกำเนิดของสายพันธุ์ได้ พันธุกรรมเฉพาะตัวทำให้สามารถเปรียบเทียบไอโซไซม์ที่สังเกตได้ในการผสมข้ามพันธุ์ กับลักษณะพื้นฐานของพ่อ แม่ ซึ่ง 6 phosphoglucomate dehydrogenase แสดงลักษณะ genotype ของ Spartain ที่สามารถบอกได้ว่า Yellow Newtown อาจจะไม่ได้มาจากพ่อเดียวกัน

Bruce and Dennis (1990) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาการเจริญเติบโตของ peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 10 ชนิด ความแตกต่างของไอโซไซม์ที่สามารถตรวจสอบได้ มี 9 ระบบ ช่วงระหว่างอายุที่นำมาทดสอบและสามารถตรวจสอบได้ผลดีที่สุด คือ อายุประมาณ 1 เดือน ซึ่งการทดลองนี้สามารถนำไปเป็นแบบแผน ที่ใช้ในการศึกษาพิจารณาต่อไป

การศึกษาลักษณะของพืชโดยใช้ ไอโซไซม์ นอกจากจะตรวจสอบถึงลักษณะการเจริญเติบโตของพืชแล้ว ยังสามารถบอกได้ถึงลักษณะที่เป็น heterozygous และ homozygous ในลูกผสมระหว่าง peach และ almond ได้ด้วย Chaparro et al. (1987) ได้ตรวจสอบลักษณะไอโซไซม์ของพืช ที่ได้จากการผสมกันระหว่างพ่อ แม่ ที่มีลักษณะพันธุกรรมที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ระหว่างpeach และ almond ด้วยวิธี Starch gel electrophoresisโดยนำเอาใบเลี้ยงหรือใบที่เพิ่งแตกออกมาใหม่นำมาทำการวิเคราะห์จากการทดลองมีเอนไซม์ phosphoglucomutase (PGM) และ 6 phosphogluconate dehydrogenase (PGD) เท่านั้นที่สามารถตรวจสอบได้ โดย PGM-2 , PGD-1 และ PGD-2 พบ monomorphic ใน peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] PGM-2 พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะ heterozygous ใน *P. amygdalus* Batsch ' Nonpareit ' ซึ่งมีผลต่อ allele ของ peach locus นี้สามารถตรวจสอบได้ว่า 50% เป็น hybrid PGD-1 และ PGD-2 สามารถตรวจสอบ ' Nonpareil ' ว่ามีลักษณะเป็นแบบ homozygous โดยเปรียบเทียบจาก band ที่เกิดขึ้น ทั้งหมดนี้จึงสามารถบอกได้ว่าเป็นลักษณะของ hybrid 100%

Mohammad and Nobumasa (1994) ได้ใช้เทคนิค Polyacrylamide gel electrophoresis ศึกษาสายพันธุ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ของ *Fortunella* โดยตรวจสอบลักษณะของไอโซไซม์ ที่สามารถนำมาพิจารณาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกัน ความสัมพันธ์ ระหว่าง 6 สายพันธุ์ของ *Fortunella* แสดงออกมาว่าไม่มีคู่ใดของสายพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนกันทุกอย่างทำให้ทราบว่าระดับความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ต่ำ จึงสรุปได้ว่าทั้ง 6 สายพันธุ์ของ *Fortunella* มีความเป็นอิสระต่อกัน

Pasuual et al. (1993) ทำการศึกษาไอโซไซม์ ในการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของ Spainish cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) 7 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค Polyacrylamide gel electrophoresis ใช้เอนไซม์ในการวิเคราะห์ 15 ชนิด ซึ่งมีเพียง 10 ชนิดที่มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปดังนี้ aconitase (ACO) alcohol dehydrogenase (ADH) glutamate oxalacetate transaminase (GOT) isocitrate dehydrogenase (IDH) leucine aminopeptidase (LAP) malate dehydrogenase (MDH) phosphoglucose isomerase (PGI) phosphoglucomutase (PGM) shikimate dehydrogenase (SKDH) และ triosephosphate isomerase (TPI) และอีก 5 ชนิดที่ไม่เกิดลักษณะใดเลย acid phosphatase (ACPH) diaphorase (DIA) malic enzyme (ME) 6 phosphoglucomic dehydrogenase (6PGDH) และ superoxide dismutase (SOD) พืชสองสายพันธุ์ Campa และ Campa Mejorada ที่มีรูปแบบของ band ที่เกิดขึ้นในเอนไซม์ทั้ง 15 ชนิด มีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ที่เห็นได้ชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างกันของไอโซไซม์ ลักษณะของไอโซไซม์ของ Campa และ Camps Mejorada บางทีสามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นพืชสายพันธุ์เดียวกัน ประโยชน์อีกด้านหนึ่งที่ได้จากการวิเคราะห์ คือสามารถแสดงว่าพืชจาก Spanish มีความแตกต่างจาก พืชที่มาจาก Californian

Santiaso et al. (1999) ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับพืช ตระกูล *Cryptogramma crispa* ซึ่งเป็นพืชที่มีลักษณะเป็นพวก tetraploid และเจริญเติบโตได้ในก้อนหินที่มีแร่ซิลิกา และแถบภูเขาสูงตามรอยแยกของหิน การศึกษาในห้องปฏิบัติการจะใช้การเจริญเติบโตของแกมิโตไฟต์ ในอาหารแข็งและนำไปปลูกในดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ การศึกษาทางไอโซไซม์จะใช้ตัวอย่างประชากรจากธรรมชาติ 5 ชนิด โดยเพิ่มแหล่งที่เป็นหลักฐานของการปรับปรุงพันธุ์ และโครงสร้างทางพันธุกรรมของสปอโรไฟต์ การศึกษาครั้งนี้ได้นำพืชมาจาก Iberian และ Scottish ซึ่งจะสามารถแสดงให้เห็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงประชากรที่อยู่ต่างพื้นที่ และต่างระบบนิเวศ morphological ของ gametophytes ได้พัฒนา เป็นชนิด *Adiantum* สปอร์จำนวนมากได้พัฒนาที่จะไปเป็นระบบ bigametophytic ได้แสดงหลักฐานในการผสมข้ามของพืชชนิดนี้ เมื่อนานมาแล้ว การผลิต gametangia โดย gametophytes ซึ่งอาจเป็นเหตุผลขั้นแรกว่าทำไม จึงหา sporophytes ที่อายุน้อยได้น้อยในป่า ค่า%ของ polymorphic loci และระดับของความใกล้เคียงกันของสายพันธุ์ที่ได้รับจากการวิเคราะห์ทางไอโซไซม์ ระดับของพันธุกรรมอาจเป็นไปได้ว่า จะเป็นพืชผสมข้าม ซึ่งคุณสมบัตินี้ ตามปกติจะรวมอยู่ใน พืชประเภทเฟิร์น ที่เป็น diploid ที่ค่อนข้างจะเป็นพวก polyploid

ความสัมพันธ์ของ henequen (*Agave fourcroydes*) ที่มีอยู่ใน germplasm ที่เป็นบรรพบุรุษ *A. angustilolia* ใน Yucatan Peminsula ในเม็กซิโก การวิเคราะห์โดยใช้ไอโซไซม์ ด้วยเทคนิค starch gel electrophoresis ผลลัพธ์ที่ออกมานั้นตรงกับการวิเคราะห์ทาง ethnobotamical และ morphological ที่มีการวิเคราะห์มาก่อนแล้ว ซึ่งแสดงความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างรุนแรง ของพืชที่ปลูกในรุ่นต่อไป ผลลัพธ์ของการส่งเสริมให้มีการผสมพันธุ์กันแบบไม่ใช้เพศช่วงกลางศตวรรษที่ผ่านมา ทำให้พืชทั้งสามพันธุ์ของ henequen มีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ โดย 2 พันธุ์ Sacki (SK) และ Yaax Ki (YK) สามารถเข้าคู่กันได้ ภายในรุ่นของลูกหลาน แต่ Kitam Ki (KK) มี MDH electrophenotype ที่ไม่สามารถหาได้ในพืชที่เจริญใน Yucatan Peninsula แต่สามารถหาได้ ในบางพันธุ์ของ *A. angustifolia* ที่เจริญในเม็กซิโก รัฐOaxaca และ Veracrus การวิเคราะห์ข้อมูลของ morphologican สามารถแสดงให้เห็นว่าทั้งสองเชื้อสาย SK และ YK เป็นกลุ่มพืชที่มีสายใยแข็งแรงและยาว ส่วนกลุ่มที่อยู่ในป่า แถบ tropical (SF) และพืชป่าอื่นๆ รวมทั้ง KK อาจนำมาถักทอได้เป็นพืชที่มีเส้นใยบอบบาง และใกล้ที่จะสูญพันธุ์ใน Yacatan ผลที่ได้นี้อาจใช้เป็น สมมติฐานได้ว่า yucatecan เป็นต้นกำเนิดของ SK และ YK จาก SF ecotype ซึ่งเป็นสมมติฐานที่ดีกว่าก่อนที่ระบุว่า KK ใน Yucatan Peninsula มีลักษณะที่เอนเอียงไปทาง *Chelem* White (ซึ่งเป็นพืชที่หายสาปสูญไปในเวลาต่อมา) (Patricia , et al. , 1999)

Asimina triloba (L.) Dunal เป็นพืชที่อยู่ในภูมิประเทศที่มีอากาศแบบ tropical ของสหรัฐอเมริกา เป็นพืชที่ได้รับการคาดหวังไว้ว่า จะมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจมากยิ่งขึ้น Hongwena and Layne (1997) จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ (*Asimina triloba* (L.) Dunal) ซึ่งใช้ลักษณะของไอโซไซม์ในการพิสูจน์โดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ clone ของ *Asimina triloba* (L.) Dunal 32 clones และเอนไซม์ 23 ระบบ แต่มีเพียง 7 ระบบที่พบ polymorphic นี้ acid phosphatase (ACP) dihydrolipoamide dehydrogenase (DDH) malic enzyme (ME) phosphoglucoisomeras (PGI) phosphoglucomutase (PGM) peroxidase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(PRX) และ shikimate dehydrogenase (SKD) ตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมทั้ง 9 ตำแหน่งของพืชทั้ง 32 clones ไม่มีความเหมือนกัน ความแปรปรวนที่เกิดจาก allozymes ในพืชชนิดนี้เหมือนค่าเฉลี่ยของพืชที่เป็นไม้ยืนต้นประเภท perennials อื่นๆ ที่บริเวณพื้นที่ที่มีช่วงอุณหภูมิที่แพร่หลายและมีระบบการผสมข้ามโดยมีแมลงเป็นสื่อ และการกระจายเมล็ดของสัตว์ ความแตกต่างของพันธุกรรมของ *Asimina triloba* (L.) Dunal วัดได้โดย Nei's distance ,D เป็นค่าที่ถาวร 496 คู่ การเปรียบเทียบระยะทางของพันธุกรรม ระหว่าง 32 clones สามารถชี้ข้อแตกต่าง โดยได้ค่าเฉลี่ย D=0.069± 0.04 และช่วงจาก 0-0.188 กลุ่มที่วิเคราะห์ (UPGMA) ได้แบ่งกลุ่มของทั้ง 32 clones ได้ 7 กลุ่ม แต่ถึงอย่างไร แต่ละกลุ่มไม่สามารถ ยืนยันประวัติการสืบพันธุ์ได้ ถ้าจะให้เห็นความแตกต่างให้มีความแม่นยำเพิ่มมากขึ้นควรเพิ่ม enzyme ที่ใช้ในการทดลอง

Royo et al. (1997) ไอโซไซม์จาก grapevine จะใช้ ราก ลำต้น และหน่อ ในการดูลักษณะของพันธุ์ชนิดต่างๆ และclone โดยแยกทางวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis เอนไซม์ในการวิเคราะห์คือ esterases , peroxidase , catechol oxidase , glutamate oxaloacetate transaminase และ acid phosphatase วัสดุที่ใช้ในการเจริญเติบโตและตัวอย่างพืชนำมาจาก 2 พื้นที่ในสเปนที่มีความแตกต่างกันในด้านของภูมิอากาศ ตัวอย่างจะนำมาทุกๆ 2 เดือน แต่ละระบบของเอนไซม์มีรูปแบบที่จำกัด โดยแถบที่ปรากฏออกมาของทั้ง 2 พื้นที่ที่นำมาและระหว่างช่วงเวลาของพืช (ฝน-หนาว) esterases มีรูปแบบที่ค่อนข้างน้อย catechol oxidase มีระบบ polymorphic ค่อนข้างมากและเห็นความแตกต่างมากในการศึกษาระบบของไอโซไซม์ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ แม้ว่าจะไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง clone ได้เหมือนกับสายพันธุ์ แต่ก็สามารถใช้วิธีการนี้กับgrapevine ในการพิจารณาได้

Bhat et al. (1992) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับไอโซไซม์ของกล้วย (*Musa* L.) โดยได้ทำการแบ่งการวิจัยออกเป็น 2 ครั้งด้วยกัน ในครั้งแรกได้ทำการทดลองโดยใช้ เอนไซม์ 3 ชนิดคือ esterase , acid phosphatase และ catalase โดยใช้เทคนิค Polyacrylamide gel electrophoresis นำกล้วยมาทำการทดลอง 44 สายพันธุ์ แบ่งเป็นพวก diploid (AB) 8 พันธุ์ troploid (AAA,AAB,ABB) 36 สายพันธุ์ของ *M. acuminata* Colla และ *M. acuminata*× *M. balbisiana* Colla. Hybrids ผลการทดลองปรากฏว่า esterase และ acid phosphatases มีระดับของ polymorphism สูง ส่วน catalase มีระดับของ polymorphic น้อย สามารถพบ phenotype ใน esterase 12 ชนิด acid phosphatases 13 ชนิด และ catalase 1 ชนิด สามารถใช้ไอโซไซม์ในการวิเคราะห์ความแตกต่างได้ 29 ชนิดจาก 44 ชนิด Bhat et al. (1992) ได้ทำการทดลองครั้งที่ 2 โดยใช้เอนไซม์ 4 ชนิดคือ peroxidase , superoxide dismutase , shikimate dehydrogenase และ matate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dehydrogenase สามารถพบ polymorphism ระดับสูงจาก peroxidase และ superoxide dismutase phenotype ที่แสดงออกใน peroxidase 12 ชนิด superoxide dismutase 16 ชนิด malate dehydrogenase 8 ชนิด และ shikimate dehydrogenase 2 ชนิด ไม่มีลักษณะใดที่สมบูรณ์ที่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นพื้นฐานต้นกำเนิดของสายพันธุ์พืช ความแตกต่างของพืชทั้ง 44 พันธุ์ สามารถช่วยอธิบาย phenotype ของเอนไซม์ทั้ง 4 ระบบ

Joanne (1998) ความแปรปรวนของไอโซไซม์ใน *Calliandra calothyrsus* ที่เกี่ยวกับพันธุ์ที่จำกัดเขต และการเก็บรักษา รูปแบบที่แตกต่างกันภายในและระหว่างประชากรของ *Calliandra calothyrsus* โดยการวิเคราะห์ไอโซไซม์ *Calliandra calothyrsus* มีพันธุ์ที่แพร่หลายในอเมริกากลางและเม็กซิโกตอนใต้ มีการข้ามสายพันธุ์โดยธรรมชาติ สัณฐานวิทยาและนิเวศน์วิทยาที่แตกต่างกันของประชากรสามารถพิสูจน์ได้ภายในช่วงนี้แต่ปัจจุบันการพิจารณาที่จะแสดงสายพันธุ์เดี่ยวของ *Calliandra calothyrsus* มีการนำมาจากหลายๆพื้นที่ของ tropics พืชชนิดนี้เป็นพืชน้ำมันหญ้าอาหารสัตว์ แก่จะมีสีเขียวและให้ร่มเงา บางครั้งมีการกล่าวว่าพืชชนิดนี้ มีถิ่นกำเนิดที่ Guatemala แต่มีส่วนน้อยที่รู้ความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่ว่าจากแหล่งที่เกิดหรือธรรมชาติ ไอโซไซม์ electrophoresis 23 locisระหว่าง 17 ประชากร ของ *Calliandra calothyrsus* ที่บ่งชี้ว่าส่วนใหญ่ความแตกต่างทางพันธุกรรม แบ่งระหว่างประชากร (Fst=0.802) และภายในประชากร heterozygosity ค่อนข้างต่ำ (mean H_o =0.057)ประชากรตามธรรมชาติระดับต่ำ ที่จะเป็น heterozygosities และส่วนใหญ่เหมือนที่มาจาก Sata Mariade Jesus ประชากรตามธรรมชาติใน southern Guatemala ความแตกต่างแบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยใช้ Nei's genetic distance และ Population Aggregation Analysis (PAA) เกี่ยวพันกับสัณฐานวิทยาและนิเวศน์วิยา ความแตกต่างสามารถสังเกตได้ภายในสายพันธุ์

การศึกษาทางด้านไอโซไซม์นอกจากจะใช้ส่วนของพืช ที่เป็นชิ้นส่วนภายนอก เช่น ก้าน ใบ ดอก แล้วยังสามารถนำส่วนของพืชที่เป็นเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทำการทดลองได้ด้วยเช่นกัน เพิ่มพงษ์และคณะ(2531) ผลการแยกเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากเนื้อเยื่อส่วนใบมะละกอ ที่เลี้ยงด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสชนิดแท่ง ที่มีความเข้มข้นของเจล10 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏว่า จากการใช้ตัวอย่างของเนื้อเยื่อมะละกอเพียง 100 มิลลิกรัม เอนไซม์ที่สกัดได้ เมื่อแยกด้วยเทคนิคทางอิเลคโทรโฟรีซีส โดยใช้ระบบ acidic buffer system พบว่า Zymogram pattern ที่ได้สามารถบ่งบอกพันธุ์และเพศของมะละกอได้อย่างชัดเจน ผลการทดลองนี้ นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจสอบพันธุ์และเพศของมะละกอ ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ โดยเฉพาะมะละกอสมบูรณ์เพศ ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการขยายพันธุ์ ด้วยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แทนการพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะช่อดอกของมะละกอ ในระยะที่เจริญเต็มวัยแล้ว

วันทนา (2538) การจำแนก *Lansium domesticum* Correa. 3 พันธุ์ คือ ลองกอง ลางสาด และดูกู จากต้นที่อายุแตกต่างกัน 3 ระยะ คือ ต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุประมาณ 4-6 เดือน ต้นอายุประมาณ 1.5 ปี และต้นอายุประมาณ 5 ปี โดยใช้เอนไซม์ 7 ระบบคือ เปอร์ออกซิเดส แอซิดฟอสฟาเทส เอสเตอเรส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส แอลกอฮอล์ ดิไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่าเอนไซม์ 4 ระบบ คือ เปอร์ออกซิเดส แอซิดฟอสฟาเทส เอสเตอเรส และฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ย้อมเจลแล้วติดสี พืชทั้งสามพันธุ์และทุกอายุสามารถจำแนกได้ดีโดยเฉพาะเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และสามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น เอนไซม์เอสเตอเรสสามารถแยกความแตกต่างได้รองลงมา ส่วนเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสให้แถบที่มีลักษณะเป็นปื้นไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน สำหรับเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ให้จำนวนแถบที่ไม่คงที่จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อการจำแนกพืชสกุล *Lansium* โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสพบว่าการปั่นตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ให้แถบที่ชัดเจนกว่า 15 นาที การสกัดเอนไซม์ด้วยสารสกัดเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย tris hydroxymethyl aminomethan (Tris – HCl) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercapthonethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรปริมาตร) เหมาะสมที่สุด และใช้เจลอะคริลาไมด์เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบที่คมชัด กว่าเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และที่สภาวะดังกล่าว สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพืชทั้งสามชนิดได้อย่างชัดเจน ทั้งในต้นอายุประมาณ 1.5 ปี และ 5 ปี และต้นที่ใช้ตรวจสอบคือ ต้นลองกองเสียบยอดที่อำเภอนาทวี และต้นลองกองเพาะเมล็ดจากอำเภอสะเดา

นอกจากจะมีการศึกษาไอโซไซม์ในพืชที่เป็นไม้ผลแล้ว ยังมีการศึกษาไปถึงพืชที่เป็นไม้ดอกไม้ประดับด้วย Martha et al. (1998) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะทางอนุกรมวิธานของ rare kentucky lady's slipper (*Cypripedium kentuckiense*) ซึ่งเป็นพันธุ์กล้วยไม้ที่หายากใน Arkansas และรัฐอื่นๆ อีก 8 รัฐ ได้มีการถกเถียงกันอย่างมากในการที่จะยอมรับ ความแตกต่างของพันธุ์ หรือพิจารณาให้มีความกระจ่างชัดที่สุดของสายพันธุ์ที่มีอยู่อย่างแพร่หลาย *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* ในการศึกษาครั้งนี้ 12 ไอโซไซม์ที่วิเคราะห์ *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* 14 ชนิด *Cypripedium kentuckiense* 8 ชนิด ข้อมูลที่ใช้ตรวจสอบลักษณะของพันธุกรรม ประเมินโดยข้อมูลของไอโซไซม์ที่มีความเกื้อหนุนอย่างต่อเนื่องหรือไม่ของ *Cypripedium kentuckiense* ที่แตกต่างกันในสายพันธุ์ และประเมินพบพันธุ์ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Virginia เป็นประชากรของ *Cypripedium kentuckiense* ที่มีพันธุกรรรมที่แยกจากประชากรอื่นๆ ของ *Cypripedium kentuckiense* ข้อมูลของไอโซไซม์ได้แสดงข้อมูลที่มีความเกี่ยวพันกันอย่างใกล้ชิดอย่างมาก และมี interspecific genetic identity สูง อย่างไรก็ดี *Cypripedium kentuckiense* อยู่ใน subset ของ *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* และมีระดับของ heterzygosity อยู่ประมาณ ¼ ของ *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* , *Cypripedium kentuckiense* เป็นหนึ่งที่มีความแพร่หลาย มี allele และ multilocus genotype ที่เหมือนกัน *Cypripedium kentuckiense* เป็นที่ยอมรับว่ามีความแตกต่างในพันธุ์ และอาจเป็นไปได้ว่า มีต้นกำเนิดมาจาก *Cypripedium parviflorum* ข้อมูลของไอโซไซม์สามารถสนับสนุนสมมุติฐานของยีนระหว่างประชากร Virginia และ ประชากรอื่นๆของ *Cypripedium kentuckiense* ที่มีจำกัด

เนื่องจากกล้วยไม้มีมากมายหลายพันธุ์ จึงได้มีการศึกษาพันธุ์กล้วยไม้กันอย่างแพร่หลาย และด้วยคุณลักษณะโดยเฉพาะของดอก จึงเป็นหนึ่งในสาเหตุใหญ่ ในความสับสนของกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการหาหลักฐานที่จะแสดงการแบ่งประเภท และลักษณะเฉพาะของพืชเพิ่มขึ้น ไอโซไซม์เป็นวิธีที่เกี่ยวกับยีน โดยใช้การเคลื่อนที่ของไฟฟ้า ผลลัพธ์ของความแตกต่างของขนาดและรูปร่างของเอนไซม์โมเลกุล สามารถเป็นเครื่องชี้บอกที่ดีในการหาความแตกต่างของพันธุกรรม *Cymbidium*ที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 12 พันธุ์ เอนไซม์ 8 ชนิด แต่มีเอนไซม์เพียง 2 ระบบ คือ malate dehydrogenase (MDH) และ phosphoglucose isomerase (GPI) ที่แสดงความแตกต่าง พันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันเป็นข้อมูลที่แสดงให้เห็นความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้ง 12 สายพันธุ์ได้อย่างมาก ข้อมูลทางไอโซไซม์จึงเกื้อหนุนการสืบหาลักษณะของพันธุ์ในทางอนุกรมวิธาน [*Cymbidium goeringii* (Rchb.f.) Rchb.f., *Cymbidium ensifolium* (L.) Swartz และ *Cymbidium sinense* (Jackson) Wild.] ทั้งหมดนี้เป็นสมาชิกของ Subgenus *Jensoa* (Rafin.) Seth&Cribb. ซึ่งทั้งหมดมีความเกี่ยวพันกันอย่างใกล้ชิดมาก (Obara-Okeyo et al. , 1998)

Easter Cactus เป็นพืชที่นิยมนำมาปลูกในกระถาง ที่กำลังได้รับการสนใจ มีหลากหลายพันธุ์ มีการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้รับสายพันธุ์ใหม่ออกมา จึงได้มีการใช้เทคนิคทาง Polyacrylamide gel electrophoresis มาศึกษาลักษณะลูก F_1 F_2 PC_1 และ S_1 ที่ได้จากการผสมกันของ Easter cactus เอนไซม์ที่นำมาใช้วิเคราะห์คือ aspartate aminotransferase (AAT) glucose-6-phosphate isomerase (GPI) malate dehydrogenase (MDH) phosphoglucomutase (PSM) และ triosephosphate isomerase (TPI) Aat-1 , Gpi-1 , Mdh-1 , Pgm-1 , Pgm-2 และ Tpi-1 สามารถระบุลักษณะได้ Aat-1 และ Pgm-1 เป็นตัวเชื่อม แต่ไอโซไซม์อื่นๆ ถือว่าเป็นพวกที่มีอิสระต่อกัน มีการแยกตัวกันภายในตระกูลน้อย จนเป็นที่น่าผิดสังเกต ซึ่งพบได้ในไอโซไซม์ทั้ง 6 ระบบ ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจจะเกิดจากการเสียรูปของไอโซไซม์บนตำแหน่งของยีนและยีนอื่นๆ ที่ก่อนหรือหลังที่จะรวมตัวกันของหน่วยสืบพันธุ์ ไอโซไซม์อาจจะใช้พิสูจน์เพื่อยืนยันการผสมกันภายในและภายนอก species เพื่อที่จะแสดงผลของวงศ์ตระกูลภายในสายพันธุ์และประเมินพันธุกรรมที่แตกต่างในพันธุ์พืชที่รวบรวมไว้ (Maureen and Thomas , 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง ใบอ่อนและก้านอ่อน ของบัวฝรั่ง บัวผันนางกวัก บัวสายชมพูซิลอน บัวผันงอกต้นบนใบ และบัวผันยงลาภ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Nymphaea spp.* (Hybrid)
ชื่อสามัญ yonglarp
ชื่อไทย ยงลาภ
ถิ่นกำเนิด ไทย

เป็นบัวผันลูกผสมปล่อย (open pollinated) ของพันธุ์ william c. uber ซึ่ง ดร. เสริมลาภ วสุวัต ได้คัดเลือกจนได้พันธุ์นี้ และตั้งชื่อขึ้นในปี พ.ศ. 2526

ลักษณะทั่วไป ใบ มีรูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 21 – 26 เซนติเมตร ขอบใบจักมนและแหลม ปลายใบมน หูใบปิดส่วนปลายครึ่งหนึ่ง ใบด้านบนมีสีเขียวทั้งอ่อนและแก่เต็มที่ ด้านล่างใบอ่อนสีเขียวอ่อน เมื่อแก่เต็มที่มีสีเขียวเหลือบชมพู ก้านใบ ก้านดอก สีเขียว เรียบ ดอกดกและทยอยออก ดอกตูมลักษณะค่อนข้างป้อม บาน 3 วัน ในช่วงเช้าถึงเย็น ดอกบานเป็นรูปถ้วย เส้นผ่าศูนย์กลาง 12 – 17 เซนติเมตร กลีบดอกซ้อน กลีบเกลี้ยงและกลีบดอกเรียวยาว ปลายแหลม กลีบเลี้ยงด้านนอกสีเขียว ด้านในมีสีเหมือนกลีบดอก คือ โคนกลีบสีขาว ส่วนบนมีสีชมพู เกสรตัวเมียสีเหลือง โคนก้านชูเกสรตัวผู้สีเหลืองสด ปลายสีบานเย็นอมม่วงเช่นเดียวกับอับเกสรตัวผู้ มีกลิ่นหอมหวาน พันธุ์นี้คล้ายกับพันธุ์ที่ชื่อ “ พราว “ แต่ต่างกันที่สีของใบและดอกจะมีสีอ่อนกว่า (เสริมลาภ , 2538)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Nymphaea nouchali* Burm.
ชื่อสามัญ -
ชื่อไทย ชมพูซิลอน , นิมเฟียนูซาลี
ถิ่นกำเนิด ศรีลังกา อินเดีย

เป็นบัวสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งไม่ปรากฏหลักฐานว่านำมาปลูกในประเทศไทยเมื่อใด

ลักษณะทั่วไป ใบมีรูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 25-30 เซนติเมตร ขอบใบจักแหลมย่น ปลายใบมน หูใบเปิด ใบอ่อนด้านบนสีเขียว มีจุดแถบประปรายใกล้ขั้วใบ เมื่อแก่เต็มที่จุดแถบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะจางหายไป ด้านล่างสีน้ำตาลแดง เส้นใบสีเขียวไม่เปลี่ยนแปลง ก้านใบ ก้านดอก สีน้ำตาลแดงมีขน ดอก ดก ออกพร้อมกันเป็นชุดและทยอยออก ดอกตูมมีลักษณะป้อม บาน 3 วัน ในช่วงใกล้ค่ำจนถึงสายๆของวันรุ่งขึ้น ดอกบานแผ่รูปครึ่งวงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 12-20 เซนติเมตร กลีบดอกซ้อน กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีโคนกว้าง ปลายเรียวแหลม กลีบเลี้ยงด้านนอกสีเขียวเหลือบน้ำตาลอ่อนเล็กน้อย ด้านในสีขาวเหลือบชมพูที่โคนกลีบ เกสรตัวเมียและอับเกสรตัวผู้สีเหลืองสด ก้านชูเกสรตัวผู้และโคนก้านสีนวล ปลายก้านสีเหลือง มีกลิ่นหอมฉุนอ่อนๆ (เสริมลาภ , 2538)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Nymphaea sp.*
ชื่อสามัญ -
ชื่อไทย นางกวักสีน้ำเงินคราม
ถิ่นกำเนิด อินเดีย

เป็นบัวผันพันธุ์พื้นเมือง

ลักษณะทั่วไป ใบ มีรูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 23-25 เซนติเมตร ขอบใบจักมนและแหลม ปลายใบมน หูใบเปิด ใบด้านบนสีเขียวทั้งอ่อนและแก่ ด้านล่างของใบอ่อนแก่มีสีเขียวเหลือบน้ำตาลแดง ก้านใบ ก้านดอก สีเขียว ไม่มีขน ดอกดก ดอกตูมค่อนข้างป้อม บาน 3-4 วัน ในช่วงเช้าจนถึงใกล้ค่ำ โดยจะบานแล้วหุบไม่สนิทเหมือนเดิม ดอกบานเป็นรูปถ้วย เส้นผ่าศูนย์กลาง 18-23 เซนติเมตร กลีบดอกซ้อนมาก กลีบเลี้ยงมีลักษณะเหมือนมีก้านของกลีบออกมาก่อน แล้วจึงมีกลีบเลี้ยงหนาต่อขึ้นมาหุ้มส่วนปลายของกลีบดอก กลีบเลี้ยงด้านนอกสีเขียว มีกลิ่นหอมหวาน (เสริมลาภ , 2538)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Nymphaea alba*
ชื่อสามัญ day lily , plaintain lily , trout lily
ชื่อไทย -
ถิ่นกำเนิด ยุโรป

เป็นบัวฝรั่งพรรณดั่งเดิมจากยุโรป แพร่หลายครั้งแรกในอังกฤษ

ลักษณะทั่วไป ดอกรูปถ้วย ขนาด 10-13 เซนติเมตร กลีบดอกโค้งกว้างปลายเรียว กลีบเลี้ยงสีขาวด้านใน ด้านนอกสีอมเขียวเหลือบน้ำตาล ใบอ่อนสีแดง เมื่อแก่ด้านบนจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว ด้านล่างสีน้ำตาลอ่อน ขนาด 10-15 เซนติเมตร (เสริมลาภ , 2525)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Nymphaea spp.* (Hybrid)

ชื่อสามัญ dauben

ชื่อไทย ดูเบน

ถิ่นกำเนิด อเมริกาใต้

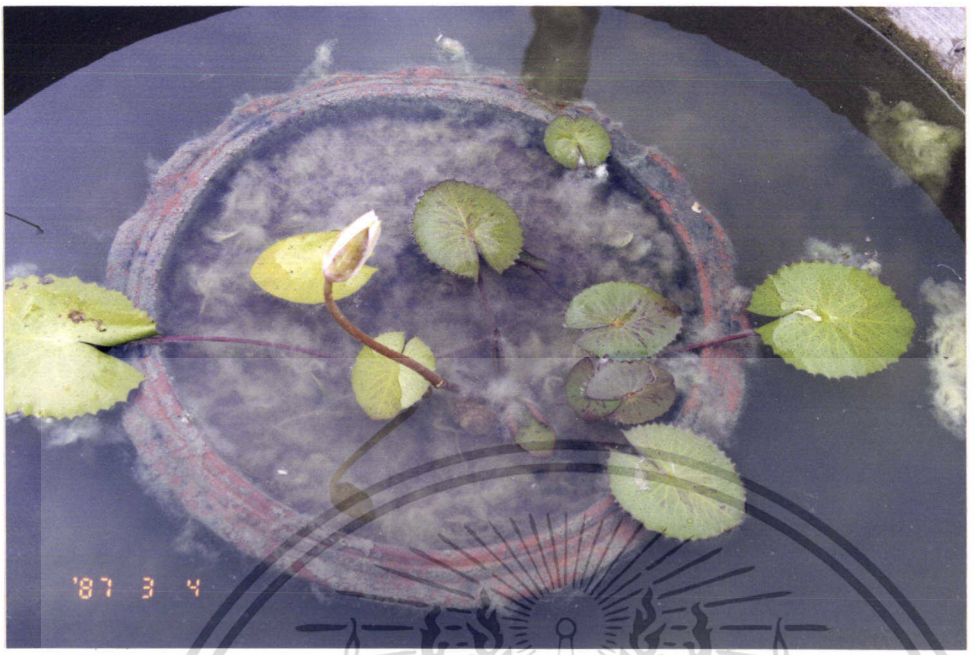
เป็นบัวที่มีลักษณะพิเศษสามารถแตกต้นอ่อนที่ขั้วใบได้ (viviparous)

ลักษณะทั่วไป ใบเป็นรูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 12-15 เซนติเมตร ขอบใบจักแหลมห่าง ปลายใบมน หูใบเปิดกางมาก ใบอ่อนด้านบนสีเขียว ขอบใบสีน้ำตาลแดง เมื่อแก่สีน้ำตาลแดงที่ขอบใบจะหายไป ด้านล่างสีเขียวเหลือบน้ำตาลแดง ทั้งใบอ่อนและใบแก่ ก้านใบก้านดอก สีน้ำตาลแดง ไม่มีขน ดอก ดก ซึ่งออกพร้อมกันเป็นชุดและทยอยออก ดอกตูมยาว บาน 3-4 วัน ในช่วงเช้าถึงเย็น ดอกบานแผ่ครึ่งวงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 10-12 เซนติเมตร กลีบดอกซ้อน กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแคบเรียว ปลายแหลม กลีบเลี้ยงด้านนอกมีสีเขียว มีจุดประปลายเข็มสีน้ำตาลแดง ด้านในมีการเปลี่ยนสี คือ เมื่อบานวันแรก โคนกลีบสีขาว ปลายกลีบสีคราม วันสุดท้ายดอกจะเป็นสีขาวทั้งดอก เกสรตัวเมีย และก้านชูเกสรตัวผู้สีเหลือง อับเกสรตัวผู้สีคราม มีกลิ่นหอมหวาน (เสริมลาภ , 2538)

ภาพที่ 1 บัวผันยงลาภ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



(a)

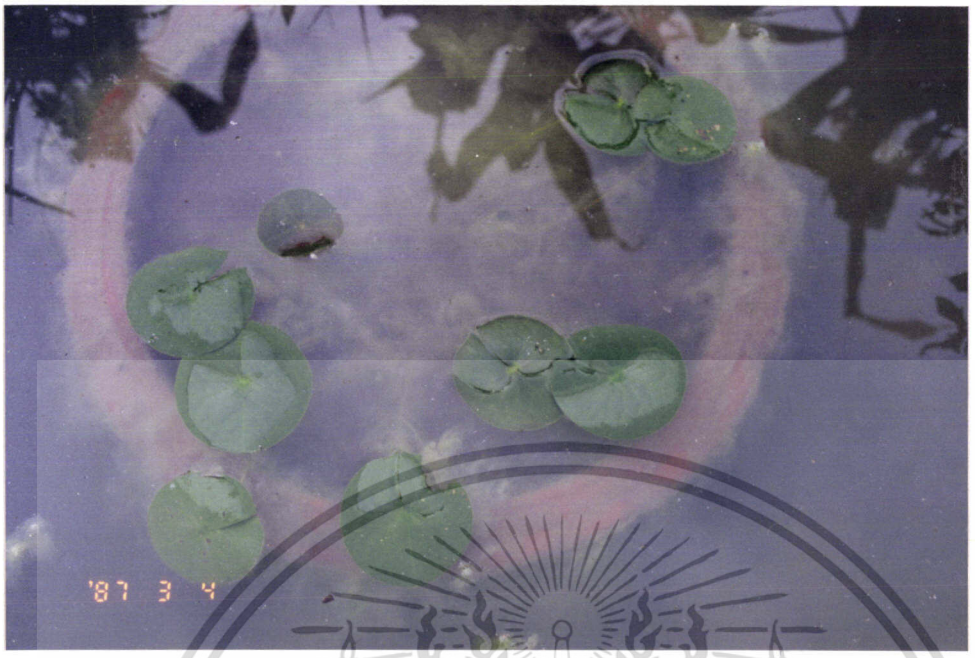
(b)

ภาพที่ 2 (a) บัวสายชมพูซิลอน

(b) บัวผันนางกวักสีน้ำเงินคราม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35913



(c)

(d)

ภาพที่ 3 (c) บัวฝรั่ง

(d) บัวผันงอกต้นบนใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 โกร่งบดตัวอย่างพืช

2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง ที่มีระบบรักษาความเย็น

2.3 เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส

2.4 เครื่องกำเนิดไฟฟ้า

2.5 เครื่องดูดอากาศ

2.6 ถาดหรือกล่องสำหรับย้อมสีเจล

2.7 micro pipette , pipette

2.8 เครื่องแก้วต่างๆ

3. อุปกรณ์ในการบันทึกผลการทดลอง

3.1 ไม้บรรทัด

3.2 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม

สารเคมี

1. Tris-HCl
2. Glycine
3. beta-mercaptoethanol
4. Polyvinylpyrrolidone (PVP)
5. Ethlenediaminetetra-acetic acid (EDTA)
6. 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)
7. $MgCl_2$
8. KCl
9. Acrylamide
10. Ammonium peroxodisulphate (APS)
11. N , N , N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
12. α-naphtylacetate
13. β-naphtylacetate
14. o-dianisidine salf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. α-keloglutaric acid
16. Aspatic acid
17. Peridoxal –5-phosphate
18. L-malic acid
19. β-Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)
20. Nitrotetrazolium blue cloride (NBT)
21. Phenazine methosolfate (PMS)
22. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate disodium salf (NADP)
23. Na-phosphate
24. L-Leucil β-naphtyl amide HCl
25. glycerol และ bromophenol blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. การสกัดเอนไซม์

1.1 นำตัวอย่างใบ และส่วนก้านที่อ่อนมาล้างให้สะอาด ด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้ง และหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปชั่งน้ำหนัก ตัวอย่างละประมาณ 1 กรัม

1.2 นำไปบดในโกร่งที่เย็นจัด

1.3 เติมสารสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) เพื่อให้เอนไซม์ถูกสกัดได้ง่ายขึ้น ปริมาณ 2 มิลลิลิตรซึ่งในการศึกษาเอนไซม์ในการทดลองนี้ได้มีการศึกษาสารสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) จำนวน 5 ชนิด ปริมาณในการเตรียมสารทั้ง 5 ชนิด จำนวน 50 ml

ชนิดที่ 1

0.1 M Tris	0.6057 g
0.1 glycine pH 8.0	0.3753 g

ชนิดที่ 2

0.1 M Tris pH 7.0	0.6057 g
0.14 M beta-mercaptoethanol	0.5 ml

ชนิดที่ 3

0.1 M Tris pH 7.0	0.6057 g
0.5% PVP	0.25 g
2 mM DTT	0.0154 g
10 mM beta-mercaptoethanol	0.034 ml or 34 µl

ชนิดที่ 4

0.1 M Tris pH 7.0	0.6057 g
1 mM EDTA	0.0146 g
0.5% PVP	0.25 g
2mM DTT	0.0154 g
10 mM beta-mercaptoethanol	0.034 ml or 34 µl

ชนิดที่ 5

0.5 M Tris pH 7.0	3.0285 g
100 mM EDTA	1.4612 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 M $MgCl_2$	4.7605 g
1 M KCl	3.725 g
10 % PVP	5 g
0.1% beta-mercaptoethanol	0.05 ml or 50 µl

1.3 นำตัวอย่างที่บดละเอียด ไปปั่นให้ตกตะกอน ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ c ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที

1.4 แยกเอาน้ำใสส่วนบน (supernatant) บรรจุใส่หลอด ependoft หลอดละ 100 ไมโครลิตร และเติม example buffer ซึ่งประกอบด้วย glycerol และ bromophenol blue จำนวน 20 ไมโครลิตร

2. การเตรียมแผ่นจล

2.1 ต่อชุดแผ่นแก้ว สำหรับทำ slap gel ใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของ gel ตามความต้องการ (0.75-1.00 มิลลิเมตร)

2.2 เตรียมสารละลายของgel 10% (separating gel) ที่ยังไม่ได้ polymerlize โดยผสมสารต่างๆ ดังนี้

น้ำกลั่น	4.8 ml
30% acrylamide	3.3 ml
3 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml
APS 1.5%	0.5 ml
TEMED	1.5 µl

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด ยกเว้น APS และ TEMED เข้าด้วยกัน ดูดอากาศซึ่งอาจจะแทรกอยู่ในสารละลายออก โดยใช้ปั๊มความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ดูดอากาศนานประมาณ 20 นาที

2.3 ค่อยๆผสม APS และ TEMED ลงในสารละลาย gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว เทสารละลาย gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว เทสารละลาย gel ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำกลั่น ให้คลุมผิว gel เพื่อรักษาผิวหน้าของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gel ทิ้งไว้ให้ gel แข็งตัว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อ gel แข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่าง gel แล้วจึงดูดน้ำออก

2.4 เตรียมสารละลาย stacking gel 7.5% จำนวน 5 ml โดยผสมสารตามส่วน ดังนี้

น้ำกลั่น	2.7 ml
30% acrylamide	0.75 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml
APS 1.5%	0.25 ml
TEMED	10 µl

เทส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น APS และ TEMED เข้าด้วยกันแล้วนำไปดูดอากาศพร้อมกับ separating gel

2.5 ใส่ APS และ TEMED ใน stacking gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว ผสมให้เข้ากันและเทลงบน separating gel สอด comb ลงใน gel ระวังอย่าให้ฟองอากาศเกิดขึ้นในช่องของ comb ทิ้งไว้ให้ gel แข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30 นาที

2.6 ดึง comb ออกจาก stacking gel หยอดน้ำกลั่นลงในช่อง ซึ่งเกิดภายหลังจากดึง comb ออก (well) เพื่อล้างช่องนั้น หลังจากนั้นดูดน้ำกลั่นออก จนเห็นช่องว่างเหล่านั้นชัดเจน

3. การแยกเอนไซม์

3.1 นำแผ่นเจล ที่เตรียมไว้ใส่ลงใน electrophoresis chamber ที่มีสารละลาย electrode buffer pH 8.3 buffer ประกอบด้วย 0.025 M Tris และ 0.192 M glycine ที่เย็น

3.2 ทำการใส่สารตัวอย่างลงในหลุม (ช่องว่างที่ดึงหวีออกแล้ว) หลุมละ 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร) เสร็จแล้วปิดฝาครอบ ต่อขั้วไฟฟ้า เข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ที่ 15 mA 150 V เมื่อสารมีลักษณะเป็นเส้นแถบจึงเปลี่ยนมาเป็น 25 mA นานประมาณ 1-2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การตรวจจับเอนไซม์

การตรวจหาตำแหน่งเอนไซม์บนแผ่นเจล ทำโดยนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาแช่ในสารละลาย substrate ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ

4.1 Esterase (EST)

4.2 Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT)

4.3 Malate Dehydrogenase (MDH)

4.4 Malic Enzyme (Me)

4.5 Leucine Amino Peptidase (LAP)

4.6 Shikimate Dehydrogenase (SKD)

5. อ่านผลการทดลอง

นำแผ่นเจลไปบันทึกภาพ เพื่อเก็บไว้เปรียบเทียบ ความแตกต่างของแถบเอนไซม์ต่างๆ ที่เกิดขึ้น และวัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration ; R_f) ซึ่งวัดได้จาก

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ “tracking dye” จากจุดเริ่มต้น}}$$

เพื่อนำไปเขียน Zymogram

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง พฤศจิกายน 2542

สิ้นสุดการทดลอง มีนาคม 2543

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

จากการศึกษา Isozyme ของบัวประดับจำนวน 5 พันธุ์ คือ บัวฝรั่ง บัวผันนางกวัก บัวสายชมพูซิลอน บัวผันงอกต้นบนใบ และบัวผันยงลาภ โดยนำส่วนของก้านอ่อนและใบอ่อนมาทำการทดลอง และเมื่อทำการทดลองสารสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) ต่างๆ 5 ชนิด ชนิดที่ 1 ประกอบด้วย 0.1 M Tris , 0.1 glycine pH 8.0 ชนิดที่ 2 ประกอบด้วย 0.1 M Tris pH 7.0 , 0.14 M beta-mercaptoethanol ชนิดที่ 3 ประกอบด้วย 0.1 M Tris pH 7.0 , 0.5% PVP , 2 mM DTT , 10 mM beta-mercaptoethanol ชนิดที่ 4 ประกอบด้วย 0.1 M Tris pH7.0 , 1mM EDTA , 0.5%PVP , 2mM DTT , 10 mM beta-mercaptoethanol ชนิดที่ 5 ประกอบด้วย 0.5 M Tris pH 7.0 , 100 mM EDTA , 1 M $MgCl_2$, 1 M KCl ,10 % PVP , 0.1% beta-mercaptoethanol เพื่อหาสารสกัดที่เหมาะสม ผลจากการศึกษาพบว่า สารสกัดชนิดที่ 3 และ 5 สามารถให้แถบที่ปรากฏคมชัดกว่าสารสกัดเอนไซม์ชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 4 , 5) และจากการนำสารสกัดทั้งสองชนิด มาตรวจดู Acivity ทาง Isozyme จำนวน 6 ระบบ ได้แก่ EST , GOT , MDH , ME , LAP และ SKD ผลที่ออกมาสารสกัดชนิดที่ 5มีความเหมาะสมมากที่สุดเพราะสามารถตรวจ Activity ได้ 2 ระบบ คือ EST และ GOT ส่วนสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 3 สามารถตรวจ Activity ได้ระบบเดียว คือ EST

รูปแบบไอโซไซม์ EST ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 3 ในบัวฝรั่ง จะเกิดแถบ 1 แถบ จากส่วนของก้าน ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ มีค่าเท่ากับ 0.568 และในส่วนของใบ เกิดแถบ 1 แถบเช่นกัน มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.613

บัวผันนางกวัก ในส่วนของก้านเกิดจำนวนแถบ 2 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ มีค่าเท่ากับ 0.616 , 0.662 และในส่วนของใบมีจำนวนแถบ 3 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.613 , 0.681 , 0.772

บัวสายชมพูซิลอน พบแถบจำนวน 2 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.651 , 0.686 ในส่วนของก้าน และส่วนของใบเกิดจำนวนแถบ 3 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.613 ,0.704 , 0.772

บัวผันงอกต้นบนใบ ในส่วนของก้านเกิดจำนวนแถบ 1 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.636 และในส่วนของใบเกิดจำนวนแถบ 1 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.613

บัวผันยงลาภ พบจำนวนแถบจากส่วนของก้าน 2 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.522 , 0636 ส่วนของใบเกิดแถบจำนวน 1 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.627

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำรูปแบบของ Isozyme มาพิจารณาเปรียบเทียบกันระหว่างบัวประดับทั้ง 5 พันธุ์ ผลที่ปรากฏสามารถแยกความแตกต่างของบัวแต่ละชนิดได้ และลักษณะของ Isozyme ของก้านและใบมีความแตกต่างกันด้วย (ภาพที่ 6 , 7)

ในการใช้ สารสกัดเอนไซม์ ชนิดที่ 5 สามารถตรวจ Activity ของ GOT บัวฝรั่ง พบว่า เกิดจำนวนแถบ 1 แถบ ในส่วนของก้าน มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.394 และพบแถบ 1 แถบ เช่นกัน ในส่วนของใบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.450

บัวผันนางกวัก ในส่วนของก้าน พบแถบจำนวน 2 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.289 , 0.421 และในส่วนของใบ พบ 2 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.300 , 0.450

บัวสายชมพูซิลอน จำนวนแถบ 2 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.307 , 0.435 ในส่วนของก้าน และส่วนของใบ มีจำนวนแถบ 2 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.300 , 0.475

บัวผันงอกต้นบนใบ ส่วนของก้านมีจำนวน 3 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.256 , 0.358 , 0.435 และส่วนของใบพบจำนวน 2 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ มีค่าเท่ากับ 0.250 , 0.450

บัวผันยงลาภ จำนวนแถบ 3 แถบ ในส่วนของก้าน ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.256 , 0.394 , 0.435 ส่วนของใบพบ 1 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.425

จะเห็นว่ารูปแบบของไอโซไซม์ GOT สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างของพันธุ์บัวประดับแต่ละสายพันธุ์ได้ และลักษณะแถบที่ปรากฏของใบและก้านมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 8 , 9)

จากการย้อมดู Activity ของ EST ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 4 เมื่อพิจารณา ในบัวฝรั่ง จำนวนแถบที่ปรากฏมี 2 แถบ ในส่วนของใบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.604 , 0.767 และในส่วนของใบ พบ 3 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.454 , 0.613 , 0.750

บัวผันนางกวัก จะพบจำนวนแถบ 2 แถบ ที่ส่วนของก้าน มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.511 , 0.627 และส่วนของใบพบ 1 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.659

บัวสายชมพูซิลอน ส่วนของก้านมีจำนวนแถบ 1 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ .0651 และส่วนของใบ มีจำนวนแถบ 3 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.627 , 0.721 , 0.791

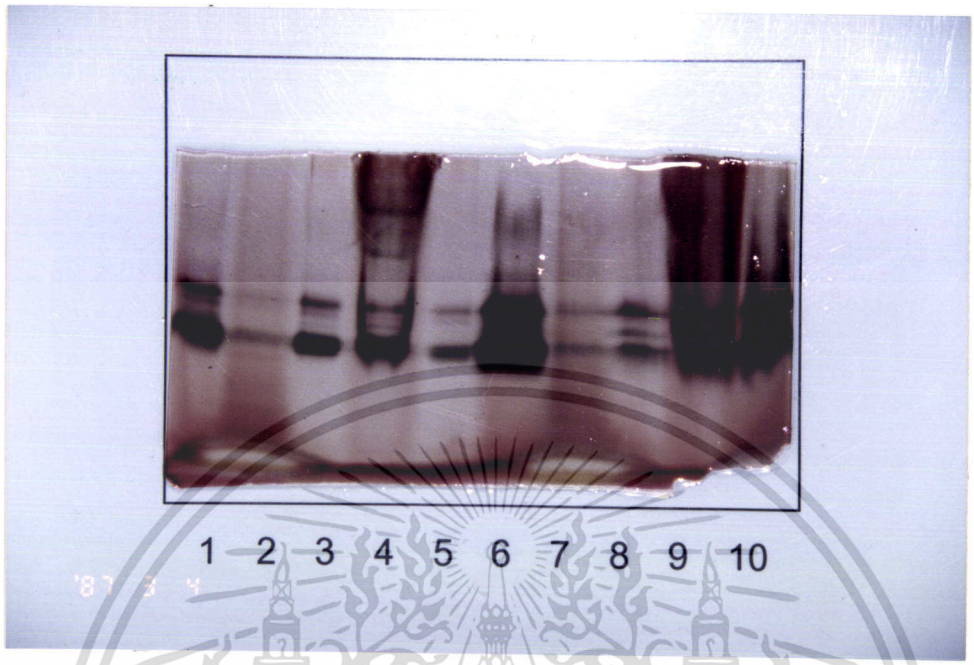
บัวผันงอกต้นบนใบ จำนวนแถบที่ปรากฏมีจำนวน 2 แถบ ในส่วนของก้าน ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.651 , 0.697 และส่วนของใบพบ 1 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.651

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

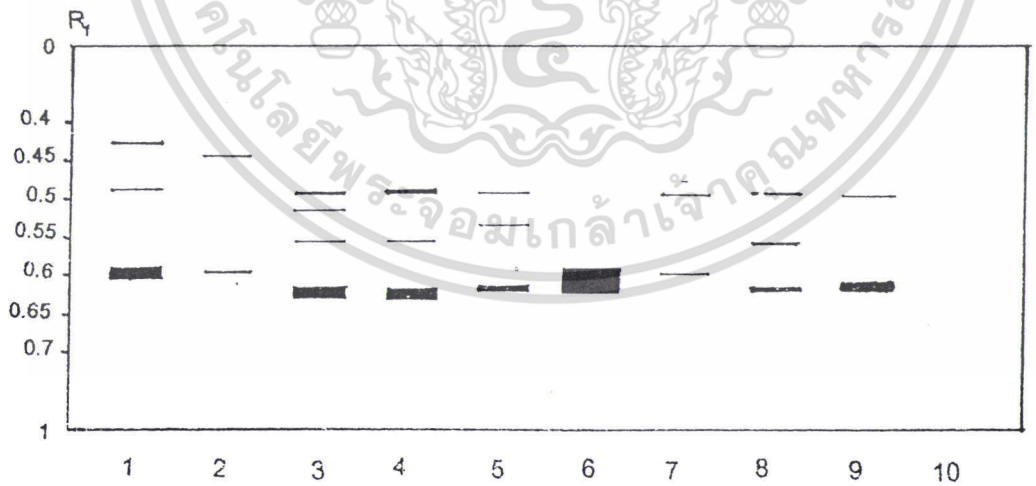
บัวผันยงลาภ ในส่วนของก้านพบจำนวนแถบ 2 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.523 , 0.659 และส่วนของใบ แถบที่ปรากฏมีจำนวน 1 แถบ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ เท่ากับ 0.627

จากลักษณะที่ปรากฏในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5 โดยใช้ไอโซไซม์ EST สามารถแยกความแตกต่างของบัวประดับทั้ง 5 พันธุ์ได้ และแถบที่ปรากฏออกมาระหว่างก้านและใบ มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 10 , 11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

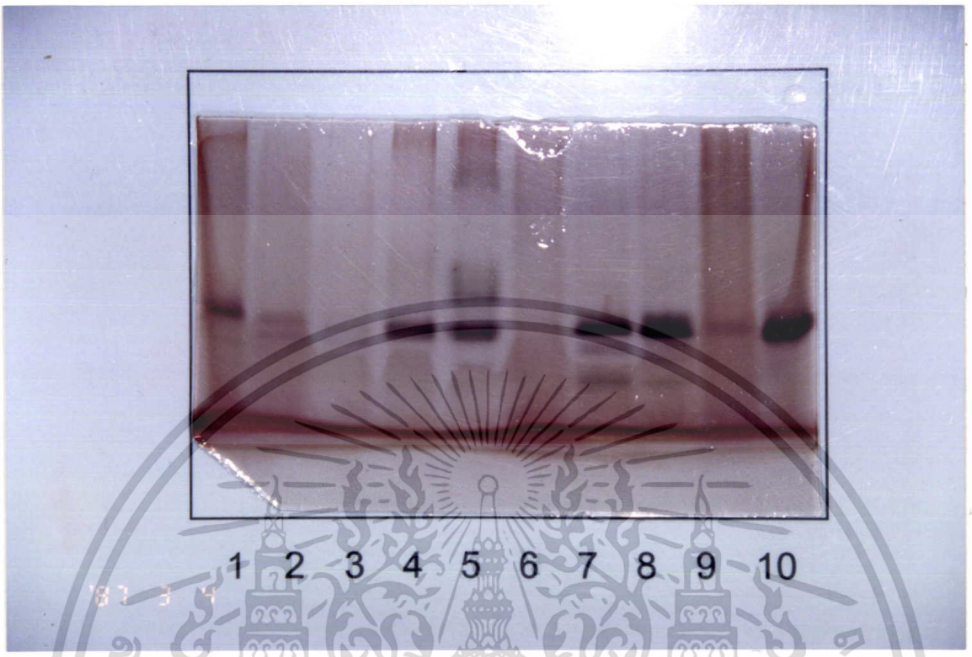


ภาพที่ 4 การแสดงออกของเอนไซม์ EST ที่ใช้เปรียบเทียบสารสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสม 5 ชนิด ในชิ้นส่วนของก้านอ่อน (1-5) และใบอ่อน (6-10)



ภาพที่ 5 รูปแบบ Zymogram ของ สารสกัดเอนไซม์ 5 ชนิด ในชิ้นส่วนของก้านอ่อน (1-5) และใบอ่อน (6-10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 รูปแบบ Isozyme Esterasesในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 3 ในชิ้นส่วนของก้านอ่อน (1-5) และใบอ่อน (6-10)

ตัวอย่างที่ 1 , 6 บัวฝรั่ง

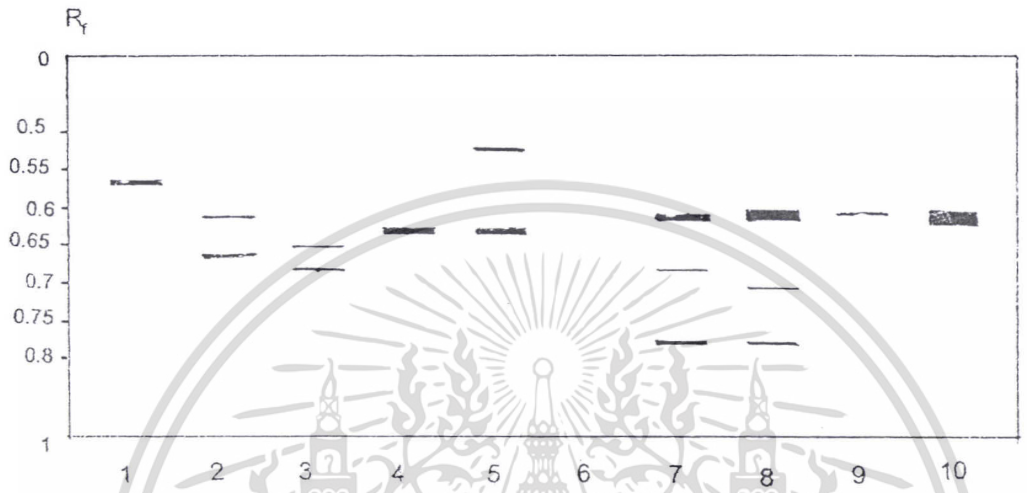
ตัวอย่างที่ 2 , 7 บัวผันนางกวัก

ตัวอย่างที่ 3 , 8 บัวสายชมพูซิลอน

ตัวอย่างที่ 4 , 9 บัวผันงอกต้นบนใบ

ตัวอย่างที่ 5 , 10 บัวผันยงลาภ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 รูปแบบ Zymogram ของ Isozyme Esterases ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 3 ชิ้นส่วนของก้านอ่อน (1-5) และใบอ่อน (6-10)

ตัวอย่างที่ 1 , 6 บัวฝรั่ง

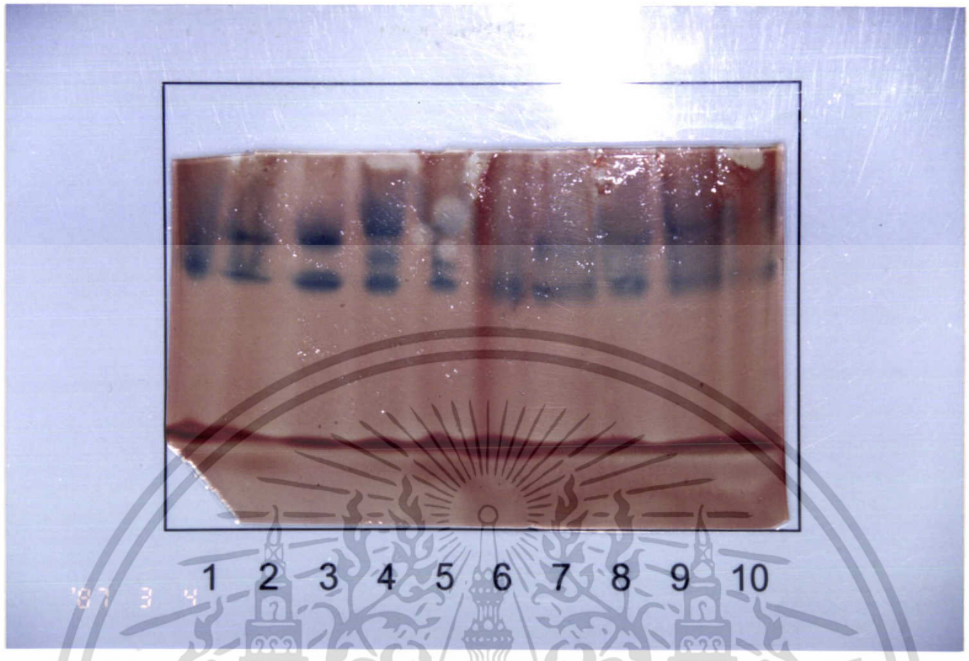
ตัวอย่างที่ 2 , 7 บัวผันนางกวัก

ตัวอย่างที่ 3 , 8 บัวสายชมพูซิลอน

ตัวอย่างที่ 4 , 9 บัวผันงอกต้นบนใบ

ตัวอย่างที่ 5 , 10 บัวผันยงลาภ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 รูปแบบ Isozyme Glutamic Oxaloacetic Transaminase ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5 ในชิ้นส่วนของก้านอ่อน (1-5) และใบอ่อน (6-10)

ตัวอย่างที่ 1 , 6 บัวฝรั่ง

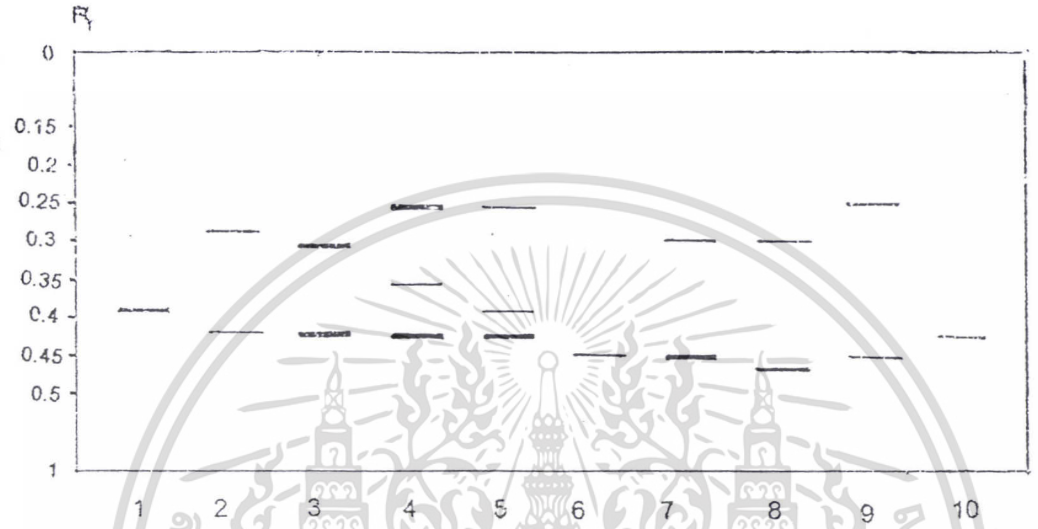
ตัวอย่างที่ 2 , 7 บัวผันนางกวัก

ตัวอย่างที่ 3 , 8 บัวสายชมพูซิลอน

ตัวอย่างที่ 4 , 9 บัวผันงอกต้นบนใบ

ตัวอย่างที่ 5 , 10 บัวผันยงลาภ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 รูปแบบ Zymogram ของ Glutamic Oxaloacetic Transaminase ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5 ชิ้นส่วนของก้านอ่อน (1-5) และใบอ่อน (6-10)

ตัวอย่างที่ 1 , 6 บัวฝรั่ง

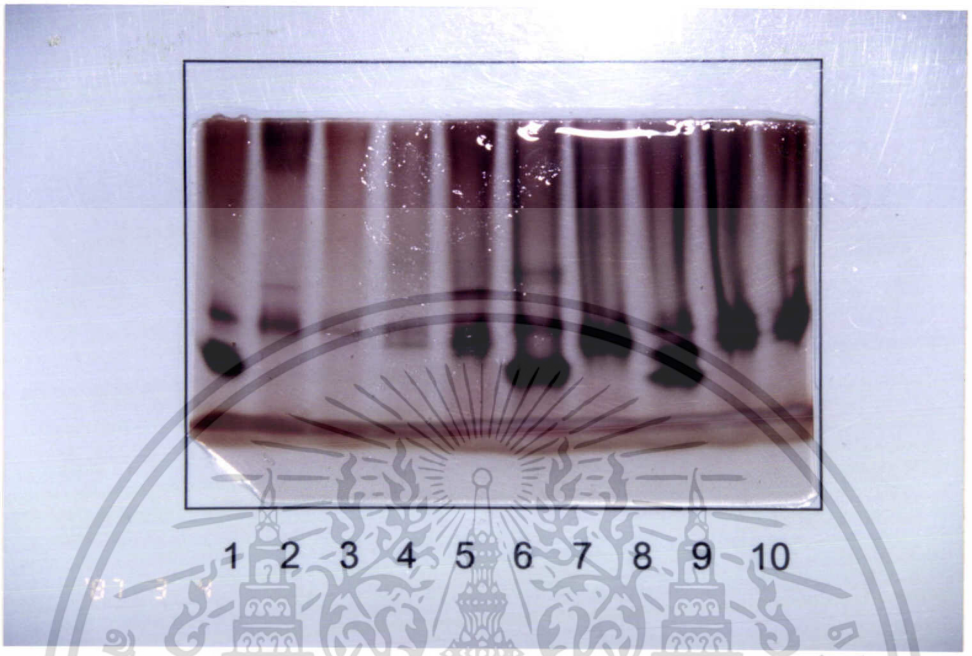
ตัวอย่างที่ 2 , 7 บัวผันนางกวัก

ตัวอย่างที่ 3 , 8 บัวสายชมพูซิลอน

ตัวอย่างที่ 4 , 9 บัวผันงอกต้นบนใบ

ตัวอย่างที่ 5 , 10 บัวผันยงลาภ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 รูปแบบ Isozyme Esterasesในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5 ชิ้นส่วนของก้านอ่อน (1-5) และใบอ่อน (6-10)

ตัวอย่างที่ 1 , 6 บัวผัรัง

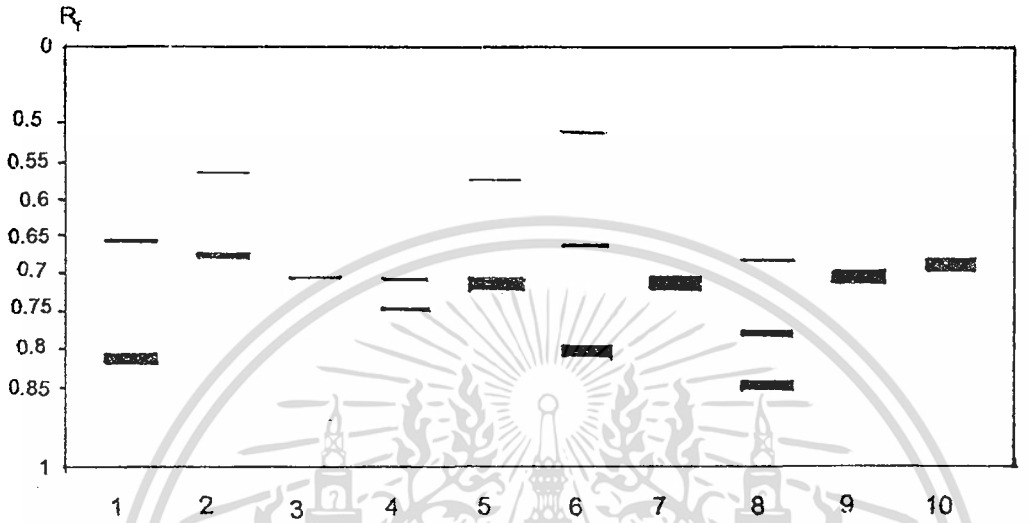
ตัวอย่างที่ 2 , 7 บัวผันนางกวัก

ตัวอย่างที่ 3 , 8 บัวสายชมพูซิลอน

ตัวอย่างที่ 4 , 9 บัวผันงอกต้นบนใบ

ตัวอย่างที่ 5 , 10 บัวผันยงลาภ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 รูปแบบ Zymogram ของ Isozyme Esterases ในสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5 ชิ้นส่วนของก้านอ่อน (1-5) และใบอ่อน (6-10)

ตัวอย่างที่ 1 , 6 บัวฝรั่ง

ตัวอย่างที่ 2 , 7 บัวผันนางกวัก

ตัวอย่างที่ 3 , 8 บัวสายชมพูซิลอน

ตัวอย่างที่ 4 , 9 บัวผันงอกต้นบนใบ

ตัวอย่างที่ 5 , 10 บัวผันยงลาภ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

ลักษณะภายนอก หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของบัวประดับ 5 พันธุ์ที่ได้นำมาทำการศึกษาแบบแผนของ Isozyme เมื่อดูจากลักษณะภายนอกแล้ว ก็สามารถเห็นความแตกต่างของบัวแต่ละพันธุ์ได้ แต่ถึงอย่างไรลักษณะภายนอกนั้นอาจจะไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าบัวประดับแต่ละพันธุ์ที่ได้นำมาทำการทดลอง จะเป็นบัวประดับต่างชนิดกันจริง เพื่อความแน่นอนจึงนำมาทำการศึกษาแบบแผนของ Isozyme จากการศึกษาหาชิ้นส่วนพืช และสารสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสม พบว่าสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5 มีความเหมาะสมที่สุดเมื่อนำมาวิเคราะห์กับบัวประดับ ผลที่ออกมานี้สอดคล้องกับการทดลองการจำแนกเพศต้นกล้าละโดยใช้การวิเคราะห์ Isozyme ที่สารสกัดเอนไซม์ชนิด 5 มีความเหมาะสมกับพืชสกุลระกำเช่นเดียวกัน (ศุจิรัตน์ และคณะ , 2538) ที่เมื่อนำมาตรวจดู Activity ของ EST และ GOT ของสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5 และ Activity ของ EST ของสารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 3 เปรียบเทียบบัวแต่ละพันธุ์แล้วปรากฏว่า สามารถแยกบัวประดับแต่ละพันธุ์ได้

จากการศึกษา ทำให้ทราบข้อมูลที่สำคัญคือ สารสกัดที่เหมาะสม ส่วนของพืชที่เหมาะสมที่จะนำมาทำการสกัด และเทคนิคต่างๆ ทาง electrophoresis ในการตรวจสอบบัวประดับ ซึ่งจะได้ใช้เป็นแนวทางในการศึกษาจำแนก clone ของบัวประดับพันธุ์เดียวกันต่อไป ว่าจะมีความแตกต่างกันในรูปแบบของ Isozyme หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา สารสกัดเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด ชนิดที่ 3 และ 5 สามารถให้แถบที่ปรากฏออกมามีความคมชัดกว่า สารสกัดชนิดอื่นๆ และเมื่อนำสารสกัดเอนไซม์ ชนิดที่ 3 และ 5 มาย้อมดู Activity พบว่า สารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 5 จะมีความเหมาะสมมากกว่า เพราะสามารถตรวจ Activity ได้ 2 ระบบ คือ EST และ GOT ซึ่ง สารสกัดเอนไซม์ชนิดที่ 3 สามารถตรวจ Activity ได้เพียงระบบเดียว คือ EST ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาทำการทดลอง คือ ใบ และก้าน เมื่อนำมาทำการทดลองหาชิ้นส่วนที่เหมาะสม ผลปรากฏว่า ใบให้แถบที่ปรากฏออกมามีความคมชัดมากกว่าส่วนของก้าน และแถบที่ปรากฏออกมาของบัวประดับทั้ง 5 พันธุ์ ส่วนของก้านและใบมีแถบที่ปรากฏออกมามีความแตกต่างกัน เมื่อนำแถบที่ปรากฏมาเปรียบเทียบ สามารถแยกความแตกต่างของบัวแต่ละพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล.2538.เทคนิคการตรวจสอบและจำแนกพันธุ์โดยใช้ Isozyme Pattern. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ การตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme Pattern และ RAPD ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.หน้า 16-36.

ชุติมา คงจรูญ.2538.การศึกษาไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบลำไยพันธุ์สีชมพู.การประชุมวิชาการครั้งที่ 1 ของสถาบันการเกษตรแม่โจ้ 5-6 มิถุนายน ณ สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ เชียงใหม่.หน้า 160-165.

ปนัดดา กาญจนะ และเกศิณี ระมิงค์วงศ์.2541.การจำแนกพันธุ์ลำไยโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส.**วารสารเกษตร** 14(2):99-110.

พานิชย์ ยศปัญญา.2540.**รวมฮิตไม้ตัดดอกเมืองร้อน**.สำนักพิมพ์มติชน กรุงเทพฯ.185หน้า.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ สมนึก พรมแดง และสมบูรณ์ บุญปรีชา.2529.การจำแนกสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจด้วยรูปแบบของไอโซไซม์.หน่วยชีวเคมีและห้องปฏิบัติการกลาง ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง.หน้า 32-40.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ ศิริวรรณบรีคำ สุพัฒน์ อรรถธรรม สังกาส พิรพยะสุรวงศ์.2531.การแยกสายพันธุ์และเพศของเนื้อเยื่อมะละกอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.**ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช**.เล่มที่ 8 ประจำเดือน ตุลาคม-ธันวาคม:หน้า 6.

วันทนา นวรังสรรค์.2538.การจำแนกพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. โดยใช้ไอโซไซม์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์(พืชศาสตร์) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล สุภาพ สุนทรนนทร์ สุขวัฒน์ จันทรปรรณิก และอัมพิกา ปุนนจิต.2538. การจำแนกเพศต้นกล้าสละโดยใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์.ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี.หน้า 1-8.

สุภาพ สุนทรนนทร์ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล สุขวัฒน์ จันทรปรรณิก และพะยงค์ เก่งกาจ.2540. เทคนิคการใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกพันธุ์และ clone ทุเรียน.**วิทยาสารสถาบันวิจัยพืชสวน** 16:35-43.

เสริมลาภ วสุวัต.2538**บัวไม้ดอกไม้ประดับ**.สำนักพิมพ์บ้านและสวน กรุงเทพฯ.297หน้า.

เสริมลาภ วสุวัต.2525.**การปลูกอุบลชาติเป็นไม้ดอกและไม้ประดับ**.อมรินทร์การพิมพ์ กรุงเทพฯ.208หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสาวณี สุริยาภณานนท์.2538.การตรวจสอบสายพันธุ์มะขามโดยใช้ไอโซไซม์.**เคหการเกษตร**19 (2):119-122.

อาภัสสรา ชมิดท์.2537.**เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส**.สำนักพิมพ์รั้วเขียว กรุงเทพฯ.85หน้า.

อุไร จิรมงคลการ.2540.**สารานุกรม ไม้ประดับในประเทศไทย เล่ม1**.สำนักพิมพ์บ้านและสวน กรุงเทพฯ.544หน้า.

Bhat, K.V. , S.R. Bhat ,and K. P. S. Chandel.1992.Survey of isozyme polymorphism for clonal identification in *Musa*.I.Esterase,acid phosphatase and catalase.**Journal of Horticultural Science** 67(4):501-507.

Bhat, K.V. , S.R. Bhat ,and K. P. S. Chandel.1992.Survey of isozyme polymorphism for clonal identification in *Musa*.II.Peroxidase,superoxide dismutase,shikimate dehydrogenase and malate dehydrogenase.**Journal of Horticultural Science** 67 (6):737-743

Bruce, D. Mowrey and Dennis J. Werner.1990.Developmental Specific Isozyme Expression in Peach.**Hort Science** 25(2):219-222.

Chaparro, J.X. , R.E. Durham , G.A. Moore ,and W.B. Sherman.1987.Use of Isozyme Techniques to Identify Peach×'Nonpareil' Almond Hybrids.**Hort Science** 22 (2):300-302.

Hongwen Huang and Desmond R. Layne.1997.Using Isozyme Polymorphisms for Identifying and Assessing Genetic Variation in Cultivated Pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal].**J. Amer. Soc. Hort.Sci.** 122(4):504-511.

Joanne, R. Chamberlain.1998.Isozyme variation in *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae):its implications for species delimitation and conservation.**American Journal of Botany** 85(1):37-47.

Jonathan F. Wendel and Norman F. Weeden.1989.Visualization and Interpretation of Plant Isozymes , p.5-33.In Dauglas E. Soltis and Pamela S. Soltis.**Isozyme in Plant Biology**.Dioscorides Press Porland.

Martha, A. Case , Henry T. Mlodozeniec , Lisa E. Wallace ,and Troy W. Weldy.1998.Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lady's Slipper *Cypripedium kentuckiense* (Orchidaceae).**American Journal of Botany** 85(12):1779-1786.

Maureen, C. O'Leary and Thomas H. Boyle.1998.Inheritance and Linkage Relationships of Isozyme in Easter cactus.**J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 123(1):98-103.

Mohammad Mizanur Rahman , Nobumasa Nito.1994.Phylogenetic relationships in the kumquat (*Fortunella*) as revealed by isozyme analysis.**Scientia Horticulturae** 57:17-28.

Obara-Okeyo, P. K. Fujji and S. Kako.1998.Isozyme Variation in *Cymbidium* Species (*Orchidaceae*).**Hort Science** 33(1):133-135.

Patricia Colunga-Garciamarin , Julian Coello-Coello , Luis E. Eguiarte ,and Dantel Pinero.1999.Isozyme variation and phylogenetic relationships between henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae).**American Journal of Botany** 86(1):115-123.

Pascual, L. , F. Perfectti , M. Gutierrez ,and A.M. Vargas.1993.Characterizing isozyme of Spanish Cherimoya cultivars.**Hort Science** 28(8):845-847.

Powell, W.1992.Plant genomes, gene markers, and linkage ,p.297-322.In Moss, J.P.**Biotechnology and improvement in Asia**.Patancheru,A.P.502 324 India.

Reiner Westermeier.1993.**Electrophoresis in Practice**.VCH New York USA.277pp.

Royo, J.B. , F. Cabello , S. Miranda , Y. Gogorcena , J. Gonzalez , S. Moreno , R. Itoiz , J.M. Ortiz.1997.The use of isoenzyme in characterization of grapevines (*Vitis vinifera*,L.).Influence of the environment and time of sampling.**Scientia Horticulture** 69:145-155.

Santiago Pajaron , Emilia Pangua ,and Lorena Garcia-Alvarez.1999.Sexual expression and genetic diversity in populations of *Cryptogramma crispa* (Pteridaceae).**American Journal of Botany** 86(6):964-973.

Scandalios J.G. and J.C. Sorenson.1977.Isozyme in Plant Tissue Cukture , p.719-720.In Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj.**Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture**.Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weeden, N.F. and R.C. Lamb.1985.Identification of Apple Cultivars by Isozyme Phenotypes.**J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 110(4):509-515.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ 6 ชนิด ที่ใช้ในการย้อมตรวจ Activity ในบัวประดับ

ดัดแปลงจาก (Jonathan F. Wendel and Norman F. Weeden , 1989)

Esterase (EST)

- Tris HCl 0.1 M pH 7 — 25 ml
- α-naphtylacetate — 10 mg
- β-naphtylacetate — 5 mg
- O-dianisidine salf or fast blue BB — 30 mg

นำ gel ไป incubate ในที่มืดอุณหภูมิ 37°c ทิ้งไว้ 15-60 นาที จนปรากฏแถบสีเทาดำ หรือสีดำ จึงนำgel ไปล้างน้ำ

Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)

- Tris HCl 0.1 M — 25 ml
- α-keloglutaric acid — 25 mg
- Aspatic acid — 50 mg
- Peridoxal sp 10% — 10 µl
- Fast Blue BB — 50 mg

นำ gel ไป incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37°c จนกระทั่งปรากฏแถบสีน้ำตาลดำ นำ gel ไปล้างน้ำ

Malate dehydrogenase (MDH)

- Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 — 25 ml
- L-malic acid — 50 mg
- NAD 10% — 100µl
- NBT 10% — 50 µl
- PMS 10% — 10 µl

นำ gel ไป incubate ที่ 37°c ในที่มืด จนกระทั่งแถบสีน้ำเงินเข้มปรากฏ นำ gel ไปล้างด้วยน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Malic enzyme (Me)

- Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 25 ml
- L-malic acid 50 µl
- NADP 10% 25 µl
- NBT 10% 50 µl
- PMS 10% 10 µl

นำ gel ไป incubate ที่ 37°c ในที่มืดจนกระทั่งแถบสีน้ำเงินเข้มปรากฏ นำ gel ไปล้างน้ำ

Leucine amino peptidase (LAP)

- Na-phosphate 0.1 M pH 6 25 ml
- L-Leucil β-naphtyl amide HCl 10% 100µl
- $MgCl_2$ 1M 500µl
- O-dianisidine 20 mg

นำ gel ไป incubate ที่ 37°c ในที่มืด

Shikimate dehydrogenase (SKD)

- This-HCl 25 ml
- Shikimic acid 15 mg
- NADP 10% 25 µl
- NBT 10% 50 µl
- PMS 10% 5 µl

นำ gel ไป incubate ที่ 37°c ในที่มืด จนกระทั่งแถบสีน้ำเงินเข้มปรากฏ นำ gel ไปล้างน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้