สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

เรื่อง การศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ของบัวหลวง

Study on Isozyme Patterns of Lotus

โดย

กัญจนา แซ่เตียว

สุเม อรัญนารถ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานผลการวิจัยเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

โครงการสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า

เจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2542

RCH
GB
205
.L7
D3825
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 36594
วัน, เดือน, ปี..... 17 ส.ค. 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
คำนำ	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลการทดลองและวิจารณ์	17
สรุป	24
เอกสารอ้างอิง	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 1 ส่วนผสมสำหรับ native-PAGE separating gel 10

ตารางที่ 2 ส่วนผสมสำหรับ native-PAGE stacking gel 11

ตารางที่ 3 การแสดงแบบแผนของไอโซไซม์ EST จากชิ้นส่วนต่างๆ และสารสกัดชนิดต่างๆในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 18

ตารางที่ 4 การแสดงแบบแผนของไอโซไซม์ GOT จากชิ้นส่วนต่างๆ และสารสกัดชนิดต่างๆในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 18

ตารางที่ 5 การแสดงแบบแผนของไอโซไซม์ MDH จากชิ้นส่วนต่างๆ และสารสกัดชนิดต่างๆในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 19

ตารางที่ 6 จำนวนแถบสีไอโซไซม์ที่พบในเอนไซม์ชนิดต่างๆในบัวหลวง 4 พันธุ์ 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

ภาพที่ 1 บัวหลวงพันธุ์ปทุม 8
ภาพที่ 2 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 8
ภาพที่ 3 บัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช 9
ภาพที่ 4 บัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์ 9
ภาพที่ 5 Zymogram ของ EST จากใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์ 21
ภาพที่ 6 Zymogram ของ EST จากก้านใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์ 21
ภาพที่ 7 Zymogram ของ GOT จากใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์ 21
ภาพที่ 8 Zymogram ของ GOT จากก้านใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์ 21
ภาพที่ 9 การแสดงออกของไอโซไซม์ EST จากใบอ่อน และก้านใบอ่อนของบัวหลวงพันธุ์ต่างๆ 22
ภาพที่ 10 การแสดงออกของไอโซไซม์ GOT จากใบอ่อน และก้านใบอ่อนของบัวหลวงพันธุ์ต่างๆ 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ของบัวหลวง

Study on Isozyme Patterns of Lotus

บทคัดย่อ

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของบัวหลวง 4 ชนิด ได้แก่ ปทุม บุณฑริก สัตตบงกช และสัตตบุษย์ ชิ้นส่วนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ใบอ่อน ก้านใบอ่อน ใบแก่ และกลีบดอก และชนิดของสารสกัดคือ (1) 0.9% NaCl (2) 0.1M Tris-HCl, 0.14M Mercaptoethanol และ (3) 0.1M Tris-HCl pH 7.0, 1mM EDTA, 0.5% PVP, 2mM DTT, 10mM Mercaptoethanol พบว่าชนิดของสารสกัดที่เหมาะสมคือ ชนิดที่3 ชิ้นส่วนที่เหมาะสมคือ ส่วนของใบอ่อน และก้านใบอ่อน ทั้งสองชิ้นส่วนให้แบบแผน ที่แตกต่างกัน และในการวิเคราะห์รูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ 12 ชนิด พบว่ามีเพียง 7 ชนิด ที่แสดงแบบแผนของไอโซไซม์ และมีเพียง 2 ชนิด คือ esterase (EST) และ glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) ที่ให้แบบแผนของไอโซไซม์ที่แตกต่างกัน GOT สามารถแยกบัวหลวงบุณฑริกออกจากพันธุ์อื่น และ EST สามารถแยกบัวพันธุ์ปทุม และบุณฑริก จากพันธุ์สัตตบงกช และสัตตบุษย์

Abstract

Isozyme patterns of 4 lotus cultivars : Pathum, Buntarik, Satabankacha, Sattabut were studied. The different plant organs: young leaf, young petiole, old left and petal and extraction buffer : (1) 0.9% NaCl (2) 0.1M Tris-HCl, 0.14M Mercaptoethanol and (3) 0.1M Tris-HCl pH 7.0, 1mM EDTA, 0.5% PVP, 2mM DTT, 10mM Mercaptoethanol were use for 12 enzyme analysis. The best enzymatic activities were obtain from young leaf and young petiole, and gave different patterns of band. The best extraction buffer was 0.1M Tris-HCl pH 7.0, 1mM EDTA, 0.5% PVP, 2mM DTT, 10mM Mercaptoethanol. 12 Enzymes were examined, only 7 enzymes showed isozyme bands and the distinct bands were achieved from EST and GOT . GOT enzyme could be used to distinguish Buntarik from other cultivars, on the other hand, Pathum and Buntarik could be separated from Satabankacha and Sattabut cultivars by EST enzyme.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn) เป็นพืชในวงศ์ (Family) Nymphaeaceae ปัจจุบันพบว่ามี 8 สกุล 50 ชนิด แต่ที่นิยมปลูกในประเทศไทยมี 3 สกุล คือ Nelumbo, Nymphaea และ Victoria บัวหลวงอยู่ในสกุล Nelumbo มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ได้แก่ อินเดีย และไทย (Suvatabandhu, 1958) บัวเป็นไม้ตัดดอกที่เกี่ยวข้องกับพุทธศาสนา ชาวพุทธนิยมใช้ดอกบัวในพิธีการทางศาสนา ในประเทศไทยบัวเป็นไม้ดอกที่มีความต้องการตลอดปี และต้องการปริมาณมากในบางช่วงเทศการทางศาสนา นอกจากใช้ประโยชน์ในแง่ตัดดอกแล้วยังสามารถปลูกบัวเพื่อวัตถุประสงค์อื่น เช่น เก็บเมล็ด ขายฝักอ่อน บัวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพในการผลิตเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถาง ซึ่งไม้ดอกชนิดนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของสีและพันธุ์ยังมีอยู่น้อย บัวหลวงที่พบว่ามีการปลูกเลี้ยงในประเทศไทยมี 4 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ปทุม บุณฑริก สัตตบงกช สัตตบุษย์ (เสริมลาภ, 2542) ไอโซไซม์อิเล็กโตรโฟริซีสเป็นวิธีการหนึ่งที่จะแสดงข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนในรูปการสังเคราะห์โปรตีนโดยเกิดแถบสีบนตัวกลางที่ค้ำจุน แถบสีที่ปรากฏจะมีแบบแผนเฉพาะสามารถนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของพืชแต่ละพันธุ์ ขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมภายในต้นพืช การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis) กับส่วนต่างๆของพืช เป็นวิธีการที่ไม่ใช้เวลาในการศึกษามากนักและสามารถตรวจสอบผลซ้ำได้อีกด้วย (Cerezo *et al.*, 1989 ; Crawford, 1983) ปัจจุบันข้อมูลทางการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลยังมีอยู่น้อย ซึ่งการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลเป็นวิธีที่พบว่ามีความแม่นยำสูงในการประเมินความแตกต่างของพันธุ์ (หทัยรัตน์ และคณะ, 2535) ซึ่งจะช่วยเสริมงานทางด้านอนุกรมวิธาน

การศึกษานี้เป็นการใช้เทคนิคไอโซไซม์เข้าช่วยจำแนกพันธุ์บัวหลวงทั้ง 4 ชนิด และการศึกษาความใกล้ชิดในแต่ละพันธุ์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

1. บัวหลวง

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ (Family) Nymphaeaceae ซึ่งเป็นวงศ์ของพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปีและเป็นพืชน้ำทั้งหมด (สุชาดา, 2530 ; Correll and Correll, 1975) และเป็นพืชที่อยู่ในสกุล (Genus) *Nelumbo* Adans (Subramanyam, 1962) และ Lawrence (1967) ได้แยกพืชสกุลบัวหลวงออกเป็น 2 ชนิด (species) คือ *Nelumbo lutea* Per. และ *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Core, 1955 ; Suvabanhu,1958)

Nelumbo lutea Per. หรือ *Nelumbo luteum* Willd. มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกา (Core, 1955) มีชื่อสามัญว่า American Lotus, Water Chinkapin หรือ Yellow Lotus (Harris and Leavy, 1975) มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางภาคเหนือและตะวันออกของสหรัฐอเมริกา (Core, 1955 ; Suvatabandhu, 1958) ดอกมีสีเหลืองอ่อนขนาด 6-10 นิ้ว ดอกจะชูขึ้น 3 ฟุต จากพื้นน้ำ ใบมีสีน้ำเงินอมเขียว และใบมีความกว้าง 1-3 ฟุต (Gilbert, 1982) บัวหลวงชนิดนี้ขึ้นได้เฉพาะที่มีอากาศหนาวเท่านั้น

Nelumbo nucifera Gaertn. หรือ *Nelumbo speciosum* Willd. หรือ *Nelumbo indica* Per. หรือ *Nelumbo nelumbo* L. Druce มีชื่อสามัญว่า Sacred Lotus, East Indian Lotus, Egyptian Lotus มีถิ่นกำเนิดในเอเชียเขตร้อน และเขตกึ่งร้อนแถบทะเลสาบแคสเบียนจนถึงญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ (สุเม, 2537)

ในประเทศไทยตามรายงานพบพืชสกุลบัวหลวง เพียงชนิดเดียว คือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. ซึ่งมีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า บัวหลวง หรือ ปทุมชาติ (วินิจวนันดร, 2498) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำจืดที่มีสภาพเป็นน้ำนิ่งแต่มีการไหลถ่ายเทได้ และมีความลึก 72.5-106.5 เซนติเมตร pH ของน้ำ 7.45 และงอกงามดีเมื่อไม่มีวัชพืชน้ำปะปน (จารีย์, 2519)

บัวหลวงมีลำต้นที่อยู่ในดิน และเหนือดินใต้น้ำ ในลำต้นมีน้ำยางขุ่นขาว ลำต้นที่อยู่ในดินใต้น้ำยาวประมาณ 0.05-1.5 เมตร ลำต้นอ่อนมีสีขาวหรือค่อนข้างแดง เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เป็นปล้องทรงกระบอกยาว 0.03-0.45 เมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.02 เมตร ตรงข้อมีตาซึ่งให้กำเนิดใบและก้านดอก ส่วนล่างมีราก ลำต้นเหนือดินใต้น้ำมีสีเขียว มีหนามสั้นๆ มีลักษณะคล้ายก้านใบและก้านดอก รากเป็นรากแบบรากย่อย เกิดบริเวณข้อของลำต้น รากอ่อนมีสีขาว เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาล ใบเป็นใบเดี่ยว แตกออกจากข้อก็จะชูเหนือน้ำ หรือจะลอยอยู่ผิวน้ำ มีรูปร่างใบเกือบกลม เส้นใบออกจากจุดกึ่งกลางใบ ก้านใบแข็งมีหนามสั้นๆ สีน้ำตาลตรงกลางมีช่องอากาศมาก ก้านใบแตกออกที่ข้อของลำต้นใต้ดิน คู่กับก้านดอก ก้านดอกมีลักษณะคล้ายกับก้านใบ กลีบเลี้ยงมีลักษณะคล้ายคลึงกับกลีบดอก ผลเป็นผลกลุ่ม (ศิริศักดิ์, 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาของวาสนา (2527) พบว่ามีหลายพันธุ์และหลายชื่อซึ่งอาจแยกออกตามลักษณะรูปร่างและสีของดอกได้ 6 พันธุ์

พันธุ์ที่ 1 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ปลายเรียว ดอกสีชมพู

มีชื่อว่า บัวหลวงชมพู ปทุมปัทมา หรือ โกกระณต

พันธุ์ที่ 2 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 1 ดอกสีขาว

มีชื่อว่า บัวหลวงขาว บุณฑริก หรือ ปุณฑริก

พันธุ์ที่ 3 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ป้อม ดอกสีชมพู

มีชื่อว่า บัวหลวงชมพูซ้อน สัตตบงกช หรือบัวฉัตรชมพู

พันธุ์ที่ 4 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ป้อมเหมือนพันธุ์ที่ 3 สีขาว

มีชื่อว่า บัวหลวงขาวซ้อน สัตตบุษย์ หรือบัวฉัตรขาว

พันธุ์ที่ 5 ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 1 สีขาว

มีชื่อว่า บัวเข็มขาว บัวปักกิ่งขาว หรือบัวหลวงจีนขาว

พันธุ์ที่ 6 ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 5 ดอกสีชมพู

มีชื่อว่า บัวเข็มชมพู บัวปักกิ่งชมพู หรือบัวหลวงจีนชมพู

จากการศึกษาทางเซลล์วิทยาพบว่า *Nelumbo* sp. มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน X=8 และจำนวนโครโมโซมของ *N. nucifera* Gaertn คือ 2n=16 (ศิริศักดิ์, 2542)

2. การใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกพันธุ์

เพิ่มพงษ์ และคณะ (2531) ใช้ไอโซไซม์ PER จากเนื้อเยื่อส่วนใบของมะละกอในการตรวจสอบพันธุ์และเพศของมะละกอ ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการขยายพันธุ์ สามารถบ่งบอกเพศและพันธุ์ได้ แทนการพิจารณาทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะช่อดอกของมะละกอ ในระยะที่เจริญเต็มวัย

สุภาพ และคณะ (2538) ศึกษาไอโซไซม์ ชนิดต่างๆ ในทุเรียน โดยวิธี polyacryamide gel electrophoresis พบว่า Peroxidase แสดงแถบสีที่บ่งชี้ให้เห็นความแตกต่างกันของพันธุ์ และพบความแตกต่างในระดับ clone

ศุจิรัตน์ และคณะ(2535) ใช้ไอโซไซม์ 13 ระบบ โดยวิธี polyacryamide gel electrophoresis ในการจำแนกเพศต้นกล้าสละ ไม่มีระบบใดเลยสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้กับเพศเมีย แต่พบว่า เอนไซม์ Peroxidase ให้แบบแผนที่แตกต่างกันในกลุ่มสละ และระกำ

สุจิตรา (2538) ใช้ Isozyme gene markers ในการวินิจฉัย clones ของแม่ไม้ (plus tree) ในสะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. siamensis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียรา และคณะ (2538) ได้ศึกษาการจำแนกชนิดของพืชกลุ่มกระเจียวพันธุ์เบาบางชนิด โดยการใช้ความแตกต่างของไอโซไซม์ พบว่าน้ำสกัดจากใบอ่อนเมื่อนำไปตรวจสอบความแตกต่างของไอโซไซม์ esteras, leucine amino peptidase และ superoxide dismutase ซึ่งให้ผลดีที่สุด สามารถบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างชนิด และความใกล้ชิดของพันธุกรรมได้ การศึกษากระเจียวพันธุ์เบาครั้งนี้สามารถยืนยันกระเจียวที่จำแนกแล้วได้ 7 ชนิด ได้แก่ *Curcuma zedoaria., C. xanthorrhiza* Roxb., *C rubescens., C. Elata* Roxb., *C. aeruginosa* Roxb. และ *Curcuma* spp. 2 ชนิด

วันทนา (2538) ใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. 3 พันธุ์คือ ลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่าสามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนในต้นที่อายุต่างๆกันทั้ง 3 ระยะ คือ ต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง อายุ 4-6 เดือน อายุ 1.5 ปี และ ต้นอายุ 5 ปี เอนไซม์ที่แยกความแตกต่างได้คือ peroxidase (PER), esterase (EST), acid phosphatase (APS), phosphoglucoisomerase (PGI) โดย PER สามารถแยกความแตกต่างได้มากที่สุด รองลงมาคือ EST ส่วน APS แถบมีลักษณะเป็นปื้นไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ส่วน PGI ให้แถบสีที่ไม่คงที่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

Bhat, *et al.* (1992) ใช้แบบแผนของไอโซไซม์ ในการจำแนกสายพันธุ์ของกล้วย โดยใช้เอนไซม์ Peroxidase (PRE), superoxide dismutase (SOD), shikimate dehydrogenase (SKDH) and malate dehydrogenase (MDH) ช่วยในการจำแนกกล้วย 44 พันธุ์ ทำให้จำแนกได้เร็วขึ้น

Royo *et al.* (1997) ใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกพันธุ์ และสายต้นขององุ่น โดยใช้เทคนิค polyacryamide electrophoresis เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ esterase, peroxidase, glutamate oxaloacetate transaminase, acid phosphatase ต้นพืชที่นำมาศึกษามาจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในสเปน พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับสายต้น

Martha *et al.* (1998) ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และอนุกรมวิธานของ *Cypripedium kentuckiense* โดยใช้ ไอโซไซม์ตรวจสอบ 12 ชนิดในการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่ามีความแตกต่างกันในพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดต่างกัน

Pascual *et al.* (1993) ทำการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของ *Annona cherimola* Mill. 7 สายพันธุ์ โดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ใช้เอนไซม์ในการวิเคราะห์ 15 ชนิด ซึ่งมีเพียง 10 ชนิดที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน และสามารถแยกความแตกต่างของพืชจากสเปนและแคลิฟอร์เนีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตู้เย็น และตู้เช่แข็ง -20 °C
2. เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (centrifuge)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า
4. เครื่องวัดความเป็นกรดและด่างของสารละลาย (pH meter)
5. โกร่งบดตัวอย่าง
6. เครื่อง degasser
7. เครื่องแก้ว
8. เครื่องชุดสำหรับอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบ slab gel
9. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
10. ตู้บ่ม (incubater)
11. ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้
12. หลอดใส่สารขนาดเล็ก (centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
13. syringe ขนาด 100 ไมโครลิตร
14. ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

สารเคมี

1. acrylamide
2. bis-acrylamide
3. ammonium persulfate (APS)
4. TEMED (N,N,N',N'- tetramethyl ethyenediamine)
5. glycerol
6. bromophenol blue
7. Tris- HCl
8. glycine
9. phenazine methyosulfate(PMS)
10. nitro blue tetrazolium (NBT)
11. β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)
12. β-nicotinamide adenine dinucleotide (NDA)
13. magnesium chloride

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. piridoxal 5P

15. calcium chloride

16. sodium phosphate

17. acetone

18. α- naphtylacetate

19. β-naphtylacetate

20. O - dianisidine salt

21. α-ketoglutaric acid

22. fast blue BB

23. aspartic acid

24. L-malic acid

25. iscitric acid

26. L- glutamic acid

27. shikimic acid

28. L-leucine β-naphthyl acid

29. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กล่องพลาสติก กล้องถ่ายรูป ฟิล์มถ่ายรูป syringe ขนาด 50 ไมโครลิตร

<u>พืชทดลอง</u>

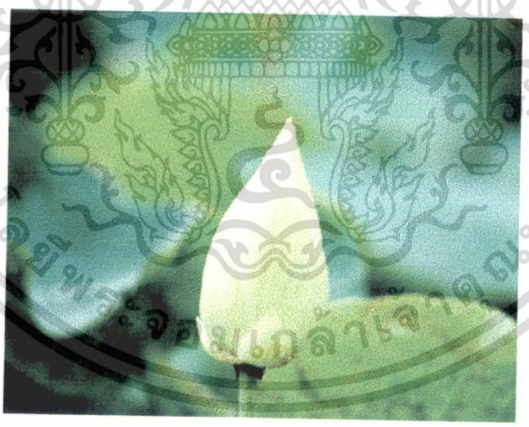
บัวหลวง 4 พันธุ์ นำมาปลูกเลี้ยงไว้ในอ่างบัวที่มีสภาพแวดล้อมเหมือนกัน บริเวณแปลงปลูกพืช ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

1. บัวหลวงพันธุ์ปทุม
2. บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
3. บัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์
4. บัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช

ชิ้นส่วนที่ใช้ทดลอง ได้แก่ ใบอ่อนยังไม่คลี่ใบ ก้านใบอ่อนที่อยู่ถัดจากใบลงมา ใบแก่ และกลีบดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

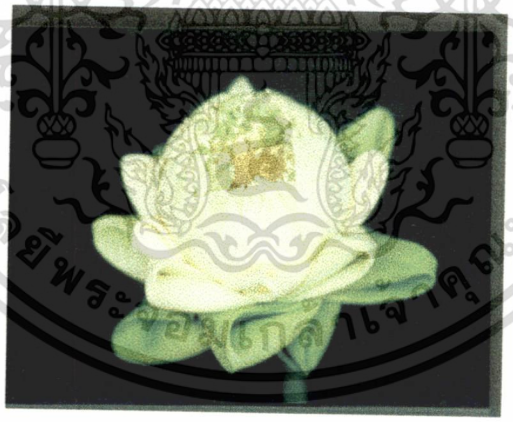
ภาพที่ 1 บัวหลวงพันธุ์ปทุม



ภาพที่ 2 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3 บัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช



ภาพที่ 4 บัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืชทดลอง

ใบอ่อน ก้านใบอ่อน ใบแก่ และกลีบดอก ที่ยังไม่บานจากบัวหลวงที่ปลูกไว้ในอ่าง นำมาล้างทำความสะอาด และเช็ดให้แห้ง แช่ไว้ในน้ำแข็ง

2. การสกัดเอนไซม์

นำชิ้นส่วนพืชมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดด้วยสารละลาย extraction buffer ชนิดต่างๆ ได้แก่ ชนิดที่ 1 0.9% NaCl ชนิดที่ 2 0.1M Tris-HCl, 0.14 M mercaptoethanol ชนิดที่ 3 0.1M Tris-HCl pH 7.0, 0.001M ethylene diamine tetraacetate (EDTA), 0.5% PVP, 0.002M dithiothreitol (DTT), 0.01M mercaptoethanol(MSH) นำไปบดในครกบดยาที่เย็นจัด อัตราส่วนที่ใช้ ชิ้นส่วนพืช 1 กรัมต่อ extraction buffer 2 มิลลิลิตร

นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกเอาส่วนที่ใสส่วนบน (supernatant)

3. การเตรียม polyacrylamide gel electrophoresis แบบ slab gel

3.1 ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของ gel ตามความต้องการ (0.75-1.00 มล.) คำนวณปริมาณของ gel ที่ จะใช้ โดยที่จะใส่ stacking gel (upper gel) สูง 1-2 เซนติเมตร เหนือ separating gel (lower gel)

3.2 เตรียมสารละลายของ gel 10% (separating gel) ที่ยังไม่ได้ polymerlize โดยผสมสารต่างๆดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมสำหรับ native-PAGE separating gel (Davis, 1964)

ส่วนประกอบของสารที่ใช้เตรียม 10% acrylamide gel	
น้ำกลั่น	4.8 มิลลิลิตร
30% acrylamide	3.3 มิลลิลิตร
3M Tris-HCl pH8.8	1.25 มิลลิลิตร
1.5% APS	0.5 มิลลิลิตร
TEMED	15.0 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด ยกเว้น ammonium persulfate และ TEMED เข้าด้วยกัน ดูดอากาศซึ่งอาจจะแทรกอยู่ในสารละลายออกโดยใช้ปั๊มความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วดูดอากาศนาน 15 นาที

3.3 ค่อยๆผสม APS และ TEMED ลงในสารละลาย gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว เทสารละลาย gel ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิว gel ทิ้งไว้ให้ gel แข็งตัว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อ gel แข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่าง gel และน้ำที่คลุมผิว gel ได้ชัดเจน

3.4 เตรียมสารละลาย stacking gel 7.5% โดยผสมสารตามส่วนที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสมสำหรับ native-PAGE stacking gel (Davis, 1964)

ส่วนประกอบของสารที่ใช้เตรียม 7.5% acrylamide gel	
น้ำ	2.7 มิลลิลิตร
30% acrylamide	0.75 มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 มิลลิลิตร
1.5% APS	0.25 มิลลิลิตร
TEMED	10.0 ไมโครลิตร

3.5. ค่อยๆล้างส่วนของ separating gel ด้วยน้ำกลั่น และดูดน้ำออก

3.6. ใส่ 1.5 % APS จำนวน 0.25 มิลลิลิตร และ TEMED 10 ไมโครลิตร ใน 5 มิลลิลิตรของ stacking gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว ผสมให้เข้ากันและเทลงบน separating gel สอด comb ลงใน gel plate ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของ comb ทิ้งไว้ให้ gel แข็งตัวใช้เวลาประมาณ 30 นาที

3.7. ดึง comb ออกจาก stacking gel หยอดน้ำกลั่นลงในช่องซึ่งเกิดภายหลังจากดึง comb ออก (well) เพื่อล้างช่องนั้น หลังจากนั้นดูดน้ำกลั่นออกจนเห็นช่องว่างเหล่านั้นชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเตรียม Sample buffer

glyceral	20	มิลลิลิตร
bromophenol blue	4	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

5. การเตรียม Running buffer

0.25 M Tris-HCl

0.192 M. glycine

6. การแยกเอนไซม์

6.1.ต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงในchamber

6.2.ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ที่สกัดได้ ผสม sample buffer อัตรา 10:1 ไมโครลิตรลงในช่องบน stacking gel ช่องละ 50มล. ค่อยๆหยอดผ่าน buffer ลงในช่อง gel

6.3. ต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber ล่าง และขั้วลบเข้ากับ chamber บน และเปิดสวิทช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสที่ 12.5 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ stacking gel และ 25 แอมแปร์ สำหรับ separating gel (100-150 โวลท์)

6.4. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เมื่อเวลาผ่านไป 2-3 ชั่วโมง สีของ bromophenol blue จะเคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของ gel

6.5. นำแผ่นกระจกออกจาก chamber และนำแผ่น gel ที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางบน plate เพื่อย้อมเอนไซม์ต่อไป

7. การย้อมสีเอนไซม์ใน gel

7.1. Esterase (EST) EC 3.1.1

Tris-HCl 0.1 M pH 7.0	25	มิลลิลิตร
α-naphtylacetate	10	มิลลิกรัม
β-naphtylacetate	5	มิลลิกรัม
fast blue BB	30	มิลลิกรัม

นำแผ่น gel ลงในสารย้อมแล้วบ่มไว้ในที่มืด 37 °C จนกว่าจะ ปรากฏแถบสี นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.2. Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) EC 2.6.1.1

Tris-HCl 0.1 M	25	มิลลิลิตร
α-ketoglutaric acid	25	มิลลิกรัม ปรับ pHให้เป็น 7.4
Aspatic acid	50	มิลลิกรัม
Piridoxal 5P 10 %	10	ไมโครลิตร
Fast Blue BB	50	มิลลิกรัม

นำแผ่น gel ลงในสารย้อมแล้วบ่มไว้ในที่มืด 37°C จนกว่าจะปรากฏแถบสี นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

7.3. Malate dehydrogenase (MDH)_ EC 1.1.1.37

Tris-HCl 0.1 M	25	มิลลิลิตร
L-malic acid	50	มิลลิกรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.5
NAD 10 %	100	ไมโครลิตร
NBT 10 %	50	ไมโครลิตร
PMS 10 %	10	ไมโครลิตร

นำแผ่น gel ลงในสารย้อมแล้วบ่มไว้ในที่มืด 37°C จนกว่าจะปรากฏแถบสี นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

7.4. Malic enzyme(ME) EC 1.1.1.40

Tris-HCl 0.1 M	25	มิลลิลิตร
L-malic acid	50	มิลลิกรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.5
$MgCl_2$	500	ไมโครลิตร
NADP 10 %	25	ไมโครลิตร
NBT 10 %	50	ไมโครลิตร
PMS 10 %	10	ไมโครลิตร

นำแผ่น gel ลงในสารย้อมแล้วบ่มไว้ในที่มืด 37°C จนกว่าจะปรากฏแถบสี นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7..5. Leucine amino peptidase (LAP) EC 3.4.11

Na-phosphate 0.1 M pH 6	25	มิลลิลิตร
L-leucil β -naphtyl acid 10 %	100	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ 1M	500	ไมโครลิตร
O-Dianisidine	20	มิลลิกรัม

นำแผ่น gel ลงในสารย้อมแล้วบ่มไว้ในที่มืด 37°C จนกว่าจะปรากฏแถบสี นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

7.6. Shikimate dehydrogenase (SKD) EC 1.1.1.25

Tris-HCl 0.1 M pH 8	25	มิลลิลิตร
Shikimic acid	15	มิลลิกรัม
NADP 10 %	25	ไมโครลิตร
NBT 10 %	50	ไมโครลิตร
PMS 10 %	5	ไมโครลิตร

นำแผ่น gel ลงในสารย้อมแล้วบ่มไว้ในที่มืด 37°C จนกว่าจะปรากฏแถบสี นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

7.7. Glutamate dehydrogenase (GLD) EC 1.4.1.2

Na-phosphate 0.2 M	25	มิลลิลิตร
L- glutalic acid	0.5	กรัม ปรับ pHให้เป็น 8
NAD 10 %	50	ไมโครลิตร
NBT 10 %	50	ไมโครลิตร
PMS 10 %	10	ไมโครลิตร
$CaCl_2$ 1 M	50	ไมโครลิตร

นำแผ่น gel ลงในสารย้อมแล้วบ่มไว้ในที่มืด 37°C จนกว่าจะปรากฏแถบสี นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.8 Peroxidase (PER)

A.	Tris-HCl 0.1 M pH4.0	40	มิลลิลิตร
	35 % H_2O_2	42	ไมโครลิตร
B.	3-amino-9-ethy carbarzole	10	มิลลิลิตร

(3-amino-9 ethylcarbazole 0.84 g., 2 naphthol 0.58 g. และ acetone 400 ml)

นำแผ่นเจลลงในสารละลาย A แล้วเติมสารละลาย B ลงไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนปรากฏแถบสี นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

7.9 Catalase (CAT)

A.	Na phosphate 0.1 M pH7.0	7.5	มิลลิลิตร
	H_2O_2 35%	500	ไมโครลิตร
	น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
B.	น้ำกลั่น	47	มิลลิลิตร
	KI 1M	3	มิลลิลิตร
	HCl 1N	1.5	มิลลิลิตร

แช่แผ่นเจลในสารละลาย A ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เทสารละลาย A ทิ้ง เติมสารละลาย B แช่ไว้ 1-2 นาที

7.10 Glucose-6- phosphate dehydrogenase (G-6PD)

Tris-HCl 0.1 M pH7.5	30	มิลลิลิตร
$MgCl_2$	300	ไมโครลิตร
NADP 10%	45	ไมโครลิตร
NBT 10%	60	ไมโครลิตร
PMS 10%	12	ไมโครลิตร
glucose-6-phosphate	120	ไมโครลิตร

นำแผ่น gel ลงในสารย้อมแล้วบ่มไว้ในที่มืด 37°C จนกว่าจะปรากฏแถบสี นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.11 Phosphoglucomutase (PGM)

Tris-HCl pH 7.5	30	มิลลิลิตร
MTT	6	มิลลิกรัม
glucose 1 phosphate	45	มิลลิกรัม
NADP 10%	45	ไมโครลิตร
PMS 10%	12	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ 1M	300	ไมโครลิตร
glucose-6-phosphate	12	unit

ผสมสารละลายแล้วเติม glucose-6-PDH ก่อนย้อม บ่มไว้ที่มืดอุณหภูมิ 37°C

7.12 Phosphoglucoismerase (PGI)

Tris-HCl pH 7.5	30	มิลลิลิตร
MTT	6	มิลลิกรัม
Fructose 6 phosphate	24	มิลลิกรัม
NADP 10%	60	ไมโครลิตร
PMS 10%	12	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ 1M	300	ไมโครลิตร
glucose-6-phosphate	6	unit

ผสมสารละลายแล้วเติม glucose-6-PDH ก่อนย้อม บ่มไว้ที่มืดอุณหภูมิ 37°C

8. การบันทึกข้อมูล

นำ gel ที่ย้อมสีแล้วมาศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ จากตำแหน่ง จำนวน ขนาด และนำค่าการมีแถบสี และไม่มีแถบสีมาวิเคราะห์กลุ่ม

อัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) = ตำแหน่งของแถบสี / ตำแหน่งของแถบสี bromophenol blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลการทดลองและวิจารณ์

ทำการศึกษาหาชิ้นส่วน และสารสกัดที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ isozyme ของบัวหลวง ชิ้นส่วนที่นำมาศึกษาได้แก่ ใบอ่อนที่ยังห่อตัวอยู่ ก้านใบอ่อน ใบแก่ และกลีบดอก สารสกัดที่นำมาศึกษาได้แก่ ชนิดที่ 1) 0.9% NaCl ชนิดที่ 2) 0.1M Tris-HCl, 0.14M Mercaptoethanol ชนิดที่ 3) 0.1M Tris-HCl pH 7.0, 1mM EDTA, 0.5% PVP, 2mM DTT, 10mM Mercaptoethanol โดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ esterase (EST), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) และ malate dehydrogenase (MDH) พบว่าในเอนไซม์ EST ใช้สารสกัดชนิดที่ 3 โดยใช้ชิ้นส่วนของใบอ่อนและก้านใบอ่อนให้แถบสีที่ดีที่สุด ส่วนสารสกัดชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 ให้แถบสีไม่ชัดในชิ้นส่วนของใบอ่อน และก้านใบอ่อน และไม่ปรากฏแถบสีในชิ้นส่วนใบแก่ และกลีบดอก (ตารางที่ 3) ในเอนไซม์ GOT พบว่าสารสกัดที่เหมาะสมที่สุดคือ ชนิดที่ 3 และชิ้นส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือ ส่วนของใบอ่อน และก้านอ่อน ส่วนสารสกัดชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 ไม่แสดงแถบสีในทุกชิ้นส่วน (ตารางที่ 4) เอนไซม์ MDH ในสารสกัดชนิดที่ 3 ชิ้นส่วนของใบอ่อน และก้านใบอ่อน ให้แถบสีแต่ไม่ชัด ในขณะที่ สารสกัดชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 ไม่ปรากฏแถบสีในทุกชิ้นส่วนของพืช (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่าสารสกัดที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาไอโซไซม์ของบัวหลวงคือ สารสกัดที่ประกอบด้วย 0.1M Tris-HCl pH7.0, 1mM EDTA, 0.5% PVP, 2mM DTT, 10mM Mercaptoethanol และชิ้นส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือ ส่วนของใบอ่อน และก้านใบอ่อน เช่นเดียวกับรายงานของ เดียรา และคณะ (2538) ที่พบความแตกต่างของไอโซไซม์ในเนื้อเยื่อของยอดอ่อนของพืชกลุ่มกระเจียว เนื่องจากระยะที่ต้นยังอ่อน เป็นระยะที่มีการพัฒนาภายในของต้นพืช และเป็นแหล่งของเอนไซม์มากกว่าบริเวณอื่น (Wendel, 1989) และพบว่าในสารสกัดบางชนิด มีทั้งสารที่เพิ่ม หรือยับยั้งคุณภาพในการสกัดเอนไซม์บางตัว เช่น PVP ช่วยไม่ให้เกิด phenolics แต่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glutamine synthetase (Sadler and Shaw, 1978)

หลังจากทำการศึกษาชิ้นส่วน และ Extraction buffer ที่เหมาะสมในเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่า ชิ้นส่วนที่เหมาะสมได้แก่ ส่วนของใบอ่อน และก้านใบอ่อน ในสารสกัดชนิดที่ 3 จึงนำมาใช้ในการจำแนกบัวหลวง 4 พันธุ์ ได้แก่ ปทุม บุณฑริก สัตตบุษย์ และสัตตบงกช โดยใช้เอนไซม์ 12 ชนิด ได้แก่ EST, GOT, G-6-DPH, PER, LAP, CAT, ME, MDH, PGI, PGM, LAD และ SKD พบว่า มีเอนไซม์ 7 ชนิด ที่แสดง activity ของเอนไซม์ คือ EST, GOT, G-6-DPH, PER, LAP, MDH และ SKD และพบว่ามีเอนไซม์เพียง 2 ชนิดคือ EST และ GOT ที่แสดง activity ที่แตกต่างกันในบัวพันธุ์ต่างๆ (ตารางที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

36594

ตารางที่ 3 การแสดงแบบแผนไอโซไซม์ EST จากชิ้นส่วนต่างๆ และสารสกัดชนิดต่างๆ ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ชิ้นส่วนพืช	สารสกัดชนิดที่ 1	สารสกัดชนิดที่ 2	สารสกัดชนิดที่ 3
ใบอ่อน	**	**	***
ก้านใบอ่อน	**	**	***
ใบแก่	*	*	**
กลีบดอก	*	*	**

*** = distinct band

** = diffused band

* = no band

ตารางที่ 4 การแสดงแบบแผนไอโซไซม์ GOT จากชิ้นส่วนต่างๆ และสารสกัดชนิดต่างๆ ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ชิ้นส่วนพืช	สารสกัดชนิดที่ 1	สารสกัดชนิดที่ 2	สารสกัดชนิดที่ 3
ใบอ่อน	*	*	***
ก้านใบอ่อน	*	*	***
ใบแก่	*	*	*
กลีบดอก	*	*	*

*** = distinct band

** = diffused band

* = no band

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 การแสดงแบบแผนไอโซไซม์ MDH จากชิ้นส่วนต่างๆ และ สารสกัดชนิดต่างๆ ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ชิ้นส่วนพืช	สารสกัดชนิดที่ 1	สารสกัดชนิดที่ 2	สารสกัดชนิดที่ 3
ใบอ่อน	*	*	**
ก้านใบอ่อน	*	*	**
ใบแก่	*	*	*
กลีบดอก	*	*	*

*** = distinct band

** = diffused band

* = no band

ตารางที่ 6 จำนวนแถบสีไอโซไซม์ที่พบในเอนไซม์ชนิดต่างๆในบัวหลวง 4 พันธุ์

Enzyme System	ใบอ่อน				ก้านใบอ่อน			
	ปทุม	บุณฑริก	สัตตบงกช	สัตตบุษย์	ปทุม	บุณฑริก	สัตตบงกช	สัตตบุษย์
EST	5	5	6	6	5	4	4	5
GOT	2	2	2	2	2	2	2	2
G-6-DPH	*	**	**	**	*	*	*	*
PER	**	**	**	**	**	**	**	**
LAP	**	**	**	**	**	**	**	**
CAT	*	*	*	*	*	*	*	*
ME	*	*	*	*	*	*	*	*
MDH	**	**	**	**	**	**	**	**
PGI	*	*	*	*	*	*	*	*
PGM	**	**	**	*	**	*	*	*
LDH	*	*	*	*	*	*	*	*
SKD	**	**	**	*	**	**	**	**

** = diffused band

* = no band

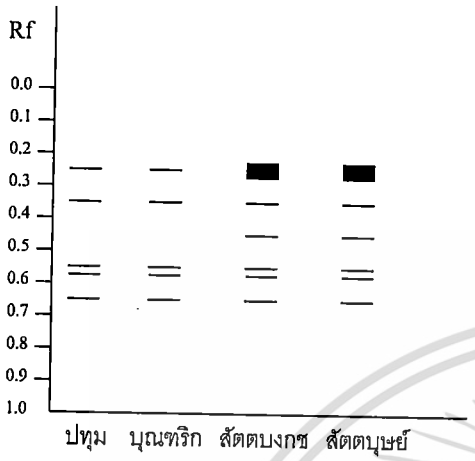
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองที่ได้นี้ใช้เอนไซม์ EST และ GOT โดยใช้ส่วนของใบอ่อน และก้านใบอ่อน และใช้สารสกัดชนิดที่ 3 เพื่อแยกความแตกต่างของบัวหลวง 4 พันธุ์

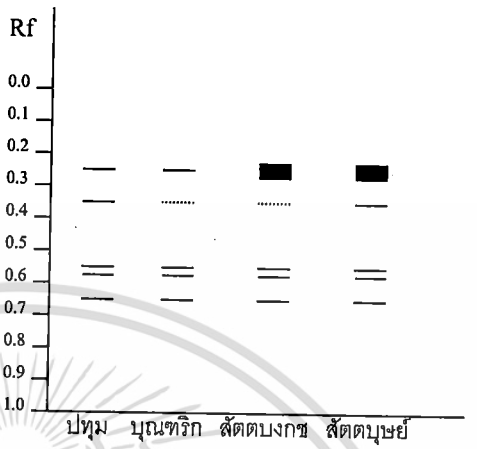
แบบแผนของเอนไซม์ EST จากส่วนของใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์ พบว่า พันธุ์ปทุม บุณฑริก ให้แบบแผนของเอนไซม์ที่เหมือนกัน คือ 5 แถบสี โดยมีค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) 0.27, 0.38, 0.56, 0.57 และ 0.64 ตามลำดับ ส่วนสัตบงกช และสัตตบุษย์ ให้แถบสี 6 แถบสี วัดค่า Rf ได้ 0.27, 0.38, 0.47, 0.56, 0.57 และ 0.64 ตามลำดับ (ภาพที่ 1 และภาพที่ 5) ในแถบที่ 1 ที่มีค่า Rf 0.27 พบว่า พันธุ์ปทุม และบุณฑริกให้แถบสีที่แคบกว่าพันธุ์สัตตบงกช และสัตตบุษย์ ซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างของบัวหลวงสองกลุ่มนี้ออกจากกัน คือพันธุ์ดอกไม่ซ้อน และพันธุ์ดอกซ้อน ส่วนค่า Rf ที่ 0.47 ที่ไม่พบในพันธุ์ปทุม และบุณฑริก แต่พบในพันธุ์สัตตบงกช และสัตตบุษย์ ยังไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนก เนื่องจากว่าในการทดสอบแต่ละครั้งผลที่ได้ยังไม่สม่ำเสมอ เมื่อศึกษาในชิ้นส่วนของก้านใบอ่อน พบว่าพันธุ์ปทุม และ สัตตบุษย์ ให้แบบแผนไอโซไซม์ 5 แถบสี เช่นเดียวกับที่พบในส่วนของใบอ่อน บุณฑริก และสัตตบงกช ให้แบบแผนไอโซไซม์ 4 แถบสี คือ มีค่า Rf 0.27, 0.56, 0.57, และ 0.64 ตามลำดับ (ภาพที่ 2 และภาพที่ 5) พบว่าแถบสีแถบที่ 1 สามารถแยกความแตกต่างของบัวพันธุ์ปทุม และบุณฑริกออกจากพันธุ์สัตตบงกช และสัตตบุษย์ได้ เช่นเดียวกับในส่วนของใบอ่อน ส่วนแถบสีแถบที่ 2 ที่ค่า Rf 0.47 ที่ไม่ปรากฏในพันธุ์บุณฑริก และสัตตบงกช ก็ยังไม่สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างในที่นี้ได้ เนื่องจากว่าในบางครั้งของการทดสอบพบว่าใน 2 พันธุ์นี้ พบแถบสีที่มีค่า Rf 0.47 เช่นเดียวกับที่พบในพันธุ์ปทุม และสัตตบุษย์

แบบแผนไอโซไซม์ GOT จากใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์ พบว่า พันธุ์ปทุม สัตตบงกช และสัตตบุษย์ ให้แถบสีเหมือนกัน คือ 2 แถบสี โดยมีค่า Rf 0.25 และ 0.34 ตามลำดับ ส่วนพันธุ์บุณฑริก ให้แถบสี 2 แถบสี มีค่า Rf 0.21 และ 0.34 (ภาพที่ 3 และภาพที่ 6) และเมื่อศึกษาในชิ้นส่วนของก้านใบอ่อน พบว่า พันธุ์ปทุม สัตตบงกช และสัตตบุษย์ ให้แถบสีที่เหมือนกัน มี 2 แถบสี มีค่า Rf 0.25 และ 0.34 ตามลำดับ ส่วนพันธุ์บุณฑริก ให้แถบสี 2 แถบสี มีค่า Rf 0.21 และ 0.34 (ภาพที่ 4 และภาพที่ 6) จากผลการทดลองนี้ สามารถแยกบัวพันธุ์บุณฑริกออกจากพันธุ์อื่นโดยใช้เอนไซม์ GOT โดยใช้ แถบสีแถบที่ 1 ที่มีค่า Rf 0.21 พบเฉพาะพันธุ์บุณฑริก ส่วนพันธุ์ปทุม สัตตบงกช และสัตตบุษย์มีค่า Rf 0.25 ผลการทดสอบพบว่าเหมือนกันทั้งในส่วนของใบอ่อน และก้านอ่อน ทำให้สามารถแยกพันธุ์บุณฑริกออกจากพันธุ์อื่น ส่วนที่ค่า Rf 0.34 ที่เหมือนกันในทุกพันธุ์นั้นในบางครั้งซ้ำไม่ปรากฏแถบสีจึงไม่นำมาพิจารณาในการแยกความแตกต่าง และพบว่าแถบสีแถบที่ 2 มักจะหายไปในบางตัวอย่างที่นำตัวอย่างที่เก็บไว้หลายวันมาทำการทดสอบ

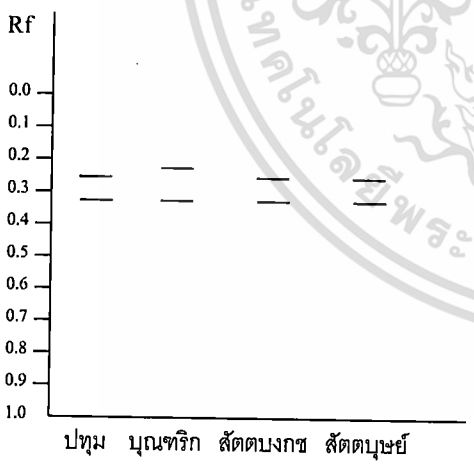
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



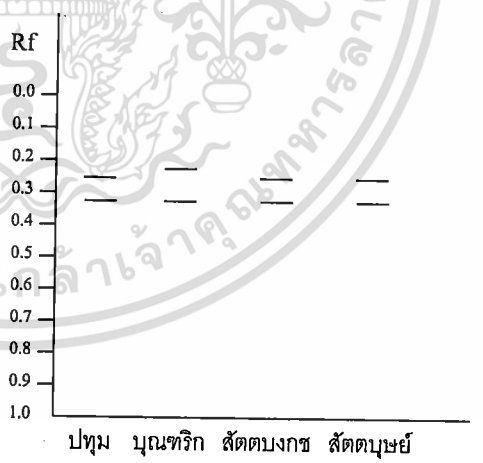
ภาพที่ 5 Zymogramของ EST จากใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์



ภาพที่ 6 Zymogramของ EST จากก้านใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์

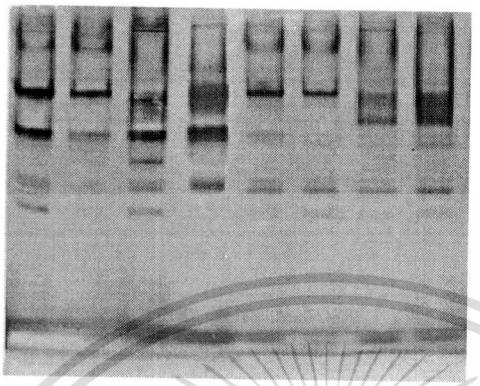


ภาพที่ 7 Zymogramของ GOT จากใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์



ภาพที่ 8 Zymogramของ GOT จากก้านใบอ่อนของบัวหลวง 4 พันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

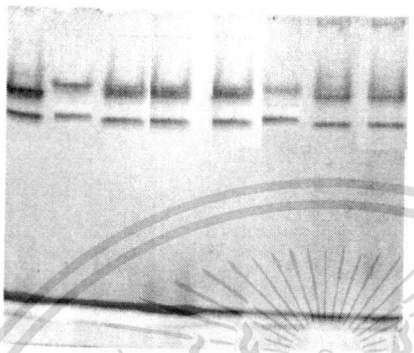


1 2 3 4 5 6 7 8

<u>ภาพที่ 9</u> การแสดงออกของไอโซไซม์ EST จากใบอ่อนและก้านใบอ่อนของบัวหลวงพันธุ์ต่างๆ

1. ใบอ่อนของบัวพันธุ์ปทุม
2. ใบอ่อนของบัวพันธุ์บุณฑริก
3. ใบอ่อนของบัวพันธุ์สัตตบงกช
4. ใบอ่อนของบัวพันธุ์สัตตบุษย์
5. ก้านใบอ่อนของบัวพันธุ์ปทุม
6. ก้านใบอ่อนของบัวพันธุ์บุณฑริก
7. ก้านใบอ่อนของบัวพันธุ์สัตตบงกช
8. ก้านใบอ่อนของบัวพันธุ์สัตตบุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



1 2 3 4 5 6 7 8

ภาพที่ 10 การแสดงออกของไอโซไซม์ GOT จากใบอ่อนและก้านใบอ่อนของบัวหลวงพันธุ์ต่างๆ

1. ใบอ่อนของบัวพันธุ์ปทุม
2. ใบอ่อนของบัวพันธุ์บุณฑริก
3. ใบอ่อนของบัวพันธุ์สัตตบงกช
4. ใบอ่อนของบัวพันธุ์สัตตบุษย์
5. ก้านใบอ่อนของบัวพันธุ์ปทุม
6. ก้านใบอ่อนของบัวพันธุ์บุณฑริก
7. ก้านใบอ่อนของบัวพันธุ์สัตตบงกช
8. ก้านใบอ่อนของบัวพันธุ์สัตตบุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการศึกษาหาสารสกัดที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของบัวหลวงโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ ศึกษาสารสกัดชนิดต่างๆ 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่1.) 0.9% NaCl ชนิดที่ 2.) 0.1M Tris-HCl, 0.14M mercaptoethanol ชนิดที่ 3.) 0.1M Tris-HCl pH 7.0, 0.001M ethylene diamine tetraacetate (EDTA), 0.5% PVP, 0.002M dithiothreitol (DTT), 0.01M mercaptoethanol(MSH) พบว่าสารสกัดชนิดที่ 3 เหมาะสมที่สุด และเมื่อศึกษาชิ้นส่วนที่ใช้ในการทดสอบ พบว่า ส่วนของใบอ่อน และก้านใบอ่อนให้ผลดีที่สุด โดยให้แถบสีที่ชัดเจนที่สุดในเอนไซม์ EST และ GOT หลังจากนั้น นำมาใช้แยกความแตกต่างของบัวหลวง 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ปทุม บุณฑริก สัตตบงกช และสัตตบุษย์ โดยใช้สารสกัดชนิดที่ 3 และชิ้นส่วนที่ใช้คือ ใบอ่อน และก้านอ่อน โดยใช้เอนไซม์ 12 ชนิด พบว่ามีเพียง 2 ชนิดที่สามารถใช้แยกความแตกต่างได้ คือ เอนไซม์ EST สามารถแยกความแตกต่างของบัวหลวงพันธุ์ดอกไม่ซ้อน พันธุ์ปทุมและบุณฑริก จากพันธุ์ดอกซ้อนพันธุ์สัตตบงกชและสัตตบุษย์ได้ เอนไซม์ GOT สามารถแยกพันธุ์บุณฑริกจากพันธุ์อื่นได้ อย่างไรก็ตาม ถ้ามีการทดสอบเอนไซม์ชนิดอื่นเพิ่มมากขึ้น อาจจะทำให้แยกบัวทั้ง 4 พันธุ์ออกจากกันได้โดยใช้เทคนิคนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เดียรา อลีซี พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. 2538. การจำแนกชนิดของพืชกลุ่มกระเจียวพันธุ์เบาบางชนิดโดยใช้ความแตกต่างของไอโซไซม์. บทคัดย่อการประชุมวิชาการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21. โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ซิตี้จอมเทียน ชลบุรี. หน้า 352-353.

จารีย์ หอมทอง. 2519. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบางชนิดในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ ศิริวรรณ บรีคำ สุพัฒน์ อรรถธรรม และสังกาส พิรพยะสุรวงศ์. 2531. การแยกสายพันธุ์และเพศของเนื้อเยื่อมะละกอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช. เล่มที่ 8. ประจำเดือน ตุลาคม-ธันวาคม: หน้า 6.

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

วาสนา มิตรานนท์ 2527. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลบัวหลวง (Nelumbo Adans.)ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 104 หน้า

วินิจวนันดร, พระยา. 2498. ไม้ประดับบางชนิดของไทย. โรงพิมพ์รุ่งเรืองธรรม, กรุงเทพฯ 81 หน้า.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร 2542. ผลของรังสีต่อการกลายพันธุ์ของบัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์ที่เลี้ยงในสภาพหลอดทดลอง วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล สุภาพ สุนทรนนทร์ อัมพิกา ปุ่นนจิต และ สุขวัฒน์ จันทรปรรณิก 2535. การจำแนกเพศต้นกล้าสละโดยใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี สถาบันวิจัยพืชสวน.

สุจิตรา จางตระกูล 2538. การใช้เทคโนโลยีชีวภาพประยุกต์ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่า. การสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 9 เรื่องพันธุศาสตร์เพื่อคุณภาพชีวิตและสิ่งแวดล้อม 22-24 มีนาคม เชียงใหม่. หน้า 6.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. พรรณไม้น้ำ. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ . 233 หน้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุภาพ สุนทรนนท์ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล สุขวัฒน์ จันทรปรรณิก พะยงค์ เก่งกาจ 2538. เทคนิคการใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกพันธุ์และ Clone ทุเรียน. ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี สถาบันวิจัยพืชสวน.

สุเม อรัญนารถ และ ทวีพงศ์ สุวรรณโร 2537. ไม้ตัดดอกเขตร้อน. กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 36-44.

สุเม อรัญนารถ 2537. ปทุมชาติ บัวตัดดอกที่อนาคตยังสดใส ชัยพฤกษ์วิทยาศาสตร์. 291 :30-32.

เสริมลาภ วสุวัต 2542. การปลูกบัวเป็นไม้ดอกไม้ประดับและใช้ประโยชน์ เอกสารประกอบการฝึกอบรม การปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับ คณะอนุกรรมการประสานงานวิจัยและพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ วันที่ 21-23 กันยายน 2542

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ กาญจนา กล้าแข็ง และสงกรานต์ จิตรากร 2535. การใช้ Isozyme ในการจำแนกเชื้อพันธุ์ข้าวในศูนย์ปฏิบัติการ และเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ. เอกสารเสนอใน การประชุมวิชาการปี 2532. ของศูนย์วิจัยปทุมธานี 19-20 กุมภาพันธ์. ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, ปทุมธานี.

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.

Cerezo, M., R. Socias and P. Arus. 1989. Identification of almond cultivars by pollen isozymes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114(1):164-169.

Core, L.E. 1955. Plant Taxonomy. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 459p.

Correll, D.S. and H.B. Correll. 1975. Aquatic and wetland plants of Southwestern United States.. Standford University Press, Standford. 1,777 p.

Crawford, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies, p.257-287. In Tanksley S.D. and T.J. Orton (eds.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. NyAcad. Sci. 121-404.

Gilbert, S. 1982. The culture of water lilies and water lotuses. Horticulture. August:16-23

Harris, W.H. and J.S. Levey. 1975. The new Columbia Encyclopedia. 4th ed. New York : Columbia University Press.

Lawrence, H.M. 1967. Nymphaeaceae. Taxonomy of Vascular Plants. Oxford & IBH. Publishing Company, Calcutta. 853 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Martha, A. Case., Henry T. Mlodozeniec., Lisa E. Wallace. And Troy W. Weldy. 1998. Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky Lady's Slipper *Cypripedium kentuckiense* (Orchidaceae). American Journal of Botany 85(12):1779-1786.

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

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

Sadler,R., and M. Shaw. 1978. A caution against the use of polyvinylpyrrolidone in the extraction of plant glutamine synthesis. Canad. J. Bot. 56: 1382-1385.

Subramanyam, K. 1962. Aquatic angiosperms. New Delhi : Council of Scientific and Industrail Research.

Suvatabandhu, K. 1958. On the Nymphaeaceae of Thailand. Nat. Hist. Siam. Soc. 17:11-12.

Wendel, J.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozyme. *In* D.E. Soltis and P.S. Soltis [eds.], Isozymes in plant biology, Volume 4: 5-45. Dioscorides Oregon.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ที่ให้ยืมอุปกรณ์

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ที่สนับสนุนสารเคมีบางส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้