ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม

Studies of Isozyme Patterns in Buntarik Lamkaew and Hybrid of Lotus

โดย

นายวัชระ บุญวิเศษ

ได้รับความเห็นชอบจาก

.....

(อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.สมภพ ฐิตะวสันต์)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

วันที่ ๒๑ เดือน มิ.ย. พ.ศ. ๔๖

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม

Studies of Isozyme Patterns in Buntarik Lamkaew and Hybrid of Lotus

โดย

นายวัชระ บุญวิเศษ

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วพ. 3382 ก
เลขหมู่ 2543
เลขทะเบียน 41679
วัน, เดือน, ปี 27 ก.ย. 2545
.b.....
.i.....

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม Studies of Isozyme Patterns in Buntarik Lamkaew and Hybrid of Lotus
โดย	นายวัชระ บุญวิเศษ
ภาควิชา	พืชสวน **สาขา** พืชสวน
คณะ	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การศึกษาไอโซไซม์ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสมด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซีส ใช้ก้านอ่อนและใบอ่อนที่ได้จากการใช้ส่วนของเอมบริโอของเมล็ดมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้สารสกัดเอนไซม์ที่ประกอบด้วย 0.1M Tris-HCl pH7.0, 1mM EDTA, 0.5% PVP, 2mM DTT และ 10mM β-mercaptoethanol ใช้ไอโซไซม์ 2 ชนิดคือ Esterase (EST) และ Peroxidase (PEX) จากการทดลองพบว่าในเอนไซม์ EST ปรากฏรูปแบบไอโซไซม์ที่ต่างกัน 7 รูปแบบ และในเอนไซม์ PEX ปรากฏรูปแบบไอโซไซม์ที่ต่างกัน 5 รูปแบบ ในการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ พบว่าบัวหลวงแหลมแก้ว และบัวหลวงพันธุ์ลูกผสมมีความใกล้เคียงกับบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Studies of Isozyme Patterns in Buntarik Lamkaew and Hybrid of Lotus
By	Mr.Watchara Boonwiset
Department	Horticulture
Faculty	Agriculture Technology
Advisor	Miss Kanjana Saetiew

Abstract

Studies of isozyme patterns of Buntarik Lamkaew and Hybrid of Lotus were investigated by using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).The plant organs were young leaf and young petiale by tissue culture.The extraction buffer was 0.1M Tris-HCl pH 7.0, 1mM EDTA, 0.5% PVP, 2mM DTT and 10mM β-mercaptoethanol.Using two enzyme systems were Esterase (EST) and Peroxidase (PEX).It was found that 7 isozyme patterns in EST and 5 isozyme patterns in PEX.The studied of isozyme patterns was found that Lamkaew and hybrid of lotus were similar to Buntarik.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์กัญจนา แซ่เตียว อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ที่กรุณาแนะนำให้ข้อคิด ตลอดจนแก้ไขปัญหาต่างๆ ตั้งแต่เริ่มแรกจนเสร็จเรียบร้อยสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาพืชสวน ที่ให้เบิกอุปกรณ์เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง รวมทั้งขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำงานทดลอง และเป็นกำลังใจให้โดยตลอด

ขอขอบคุณภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การศึกษาและสถานที่ในการปฏิบัติงาน

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษามาโดยตลอด ตลอดจนน้องสาว และทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจตลอดมา

นายวัชระ บุญวิเศษ

มีนาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญภาพ	(ก)
สารบัญตาราง	(ค)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
วันและสถานที่ทำการทดลอง	18
ผลการทดลอง	19
สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก	13
ภาพที่ 2	บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว	13
ภาพที่ 3	บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม	14
ภาพที่ 4 (a)	ตัวอย่างที่ 1-4 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ตัวอย่างที่ 5-8 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว ตัวอย่างที่ 9-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม	19
(b)	ตัวอย่างที่ 1-2 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ตัวอย่างที่ 3-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม	20
(c)	ตัวอย่างที่ 1-3 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ตัวอย่างที่ 4-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม	20
(d)	ตัวอย่างที่ 1-3 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ตัวอย่างที่ 4-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม	21
ภาพที่ 5	แสดงรูปแบบไอโซไซม์ EST 7 แบบในบัวหลวงบุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม	21
ภาพที่ 6 (a)	ตัวอย่างที่ 1-4 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ตัวอย่างที่ 5-8 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว ตัวอย่างที่ 9-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม	23
(b)	ตัวอย่างที่ 1-3 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ตัวอย่างที่ 4-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

(c) ตัวอย่างที่ 1-3 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 24
ตัวอย่างที่ 4-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว
ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม

ภาพที่ 7 แสดงรูปแบบไอโซไซม์ PEX 5 แบบในบัวหลวงบุณฑริก
แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	แสดงกลุ่มรูปแบบของไอโซไซม์ ESTในบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์ พันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง	23
ตารางที่ 2	แสดงกลุ่มรูปแบบของไอโซไซม์ PEX ในบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

บัวหลวงเป็นไม้ตัดดอกที่รู้จักและนิยมนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างมาก มีทั้งที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ ปลูกเป็นไม้ประดับ และปลูกเป็นจำนวนมากเพื่อใช้เป็นการค้า ให้ผลผลิตตลอดทั้งปี สามารถเก็บผลผลิตได้หลายครั้ง ทำให้มีรายได้ตลอดทั้งปี นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ อีกมาก เช่น ใช้เป็นอาหารโดยอาจรับประทานสดโดยใช้ส่วนของเหง้า เมล็ดอ่อน เมล็ดแก่ หรือทำเป็นสลัด (อุทัย, 2525) เป็นยารักษาโรค เช่น เป็นยาแก้ร้อนใน แก้ท้องร่วง บำรุงกำลัง แก้โรคริดสีดวงทวาร แก้โรคกษัยและลำไส้อักเสบ ส่วนกลีบดอกใช้เป็นยาแก้โรคหนองใน บำรุงหัวใจ สมานแผล เกสรตัวผู้ใช้ทำยาหอม บำรุงหัวใจ ขับปัสสาวะ ขับเสมหะ ใช้ทำเครื่องสำอาง (สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย, 2518)

บัวหลวงบุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสมมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก ซึ่งในการจำแนกพันธุ์ในปัจจุบันจะเน้นในด้านความแตกต่างของลักษณะทางสันฐานวิทยา เช่น ลักษณะใบ ลักษณะทรงพุ่ม ลักษณะผลเป็นสำคัญ ซึ่งการจำแนกวิธีนี้จะต้องใช้เวลานานและอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย โดยเฉพาะในพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางสายเลือดจะมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก (สุภาพและคณะ, 2540)

ปัจจุบันการศึกษาวิทยาศาสตร์บางสาขาสามารถนำมาใช้ประโยชน์กับงานด้านการจำแนกพันธุ์พืชมากขึ้น วิธีการหนึ่งก็คือ เทคนิคทางชีวเคมี ที่เรียกว่าอิเลคโทรโฟรีซีส โดยแยกและศึกษาชนิดเอนไซม์ในพืชที่เรียกว่าไอโซไซม์ (เพิ่มพงษ์และคณะ, 2532; Pasteur *etal*,1988; ปนัดดาและเกศินี, 2541) วิธีนี้สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพืชพันธุ์ต่างๆ ได้ว่าเหมือนกันทุกประการหรือคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกัน โดยใช้คุณสมบัติของไอโซไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งถูกควบคุมด้วยยีน ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการกำหนดลักษณะทางพันธุกรรม โดยความแตกต่างความเหมือนหรือความคล้ายคลึงของเอนไซม์ จะเป็นตัวบ่งชี้ความใกล้ชิดหรือความแตกต่างกันทางพันธุกรรม (เสาวณี, 2538)

การศึกษาเรื่องนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อนำเทคนิคทางอิเลคโทรโฟรีซีสมาใช้ในการจำแนกพันธุ์บัวหลวงบุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสมซึ่งมีลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันมาก และเพื่อเสริมงานด้านอนุกรมวิธานที่มีประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช และการจำแนกพันธุ์พืชให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พันธุ์แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม
2. เพื่อประโยชน์ทางด้านอนุกรมวิธานในการจำแนกสายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

บัวหลวง เป็นพืชที่อยู่ในสกุล (genus) *Nelumbo* Adans. (Backer and Bakhuizen,1963) วงศ์ (Family)Nymphaeceae ซึ่งเป็นวงศ์ของพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปีที่เป็นพืชน้ำทั้งหมด (สุชาดา,2530; Correll and Correll,1975) โดยพืชในวงศ์นี้มี 8 สกุล 50 ชนิด (ณพพร,2530) มีผู้รวบรวมสกุลบัวที่พบในประเทศไทยมี 4 สกุลคือ Nelumbo, Nymphaea, Victoria และ Braelaya (กสิน,2500) แต่ที่นิยมปลูกมีเพียง 3 สกุล ซึ่งถ้าจะเรียบเรียงตามแบบนักพฤกษศาสตร์จะได้ดังนี้

1. สกุลนีลัมโบ (Nelumbo) ใบชูเหนือน้ำได้แก่ บัวหลวง
2. สกุลนิมเฟีย (Nymphaea) ใบลอยแตะผิวน้ำ ไม่มีหนามได้แก่ บัวผัน บัวเผื่อน
3. สกุลวิคตอเรีย (Victoria) ใบลอยแตะผิวน้ำ ใบใหญ่ มีหนามได้แก่ บัวกระด้ง

แต่ละสกุลยังแยกออกเป็นอีกหลายชนิด หลายพันธุ์ ทั้งพันธุ์แท้และพันธุ์ลูกผสม (hybrid) นอกจากนี้ในทางเกษตรศาสตร์ยังมีการแบ่งประเภทออกไปอีก โดยเฉพาะในต่างประเทศ (สุปราณี,2540)

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในสกุล (Genus) *Nelumbo* Adans(Backer and Bakhuizen,1963 และ Lawrence,1967) ได้แยกพืชสกุลบัวหลวงออกเป็น 2 ชนิด(species)คือ *Nelumbo lutea* Pers. และ *Nelumbo nucifera* gaerth.(Core,1955; Suvatabandhu,1958)

Nelumbo Lutea Pers.หรือ *Nelumbium luteum* Willd.มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกา มีชื่อสามัญว่า American Lotus, Water Chinkapin หรือ Yellow Lotus (Harris and Leavy, 1975) มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของสหรัฐอเมริกา ดอกมีสีเหลืองอ่อนขนาด 6-10 นิ้ว ดอกจะชูขึ้น 3 ฟุตจากพื้นน้ำ ใบมีสีน้ำเงินอมเขียว และใบมีขนาดความกว้าง 1-2 ฟุต บัวหลวงชนิดนี้ขึ้นได้เฉพาะที่มีอากาศหนาวเท่านั้น มีรายงานว่าเคยมีผู้นำเข้ามาปลูกในประเทศไทย แต่ไม่สามารถเจริญได้ (วินิจวนันดร,2498;Suvatabandhu,1958)

Nelumbo Nucifera Gaerth.หรือ *Nelumbium speciosum* Willd. หรือ*Nelumbo indica* Pers. หรือ *Nelumbium nelumbo*(L) Druce มีชื่อสามัญว่า Sacred Lotus, East Indian Lotus, Egyptian Lotus มีถิ่นกำเนิดในเอเชียเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนแถบทะเลสาบแคสเบียนจนถึงญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ จีน ธิเบต และอาจพบได้ในรัฐฮาวาย

สำหรับในประเทศไทยตามรายงานพบพืชสกุลบัวหลวงเพียงชนิดเดียวคือ *Nelumbo nucifera* Gaertn.ซึ่งเรียกกันโดยทั่วไปว่า บัวหลวง หรือ ปทุมชาติ (วนิจวนันดร,2498; กสิน,2500) สามารถเจริญได้ดีในน้ำจืดที่มีสภาพเป็นน้ำนิ่งแต่การไหลถ่ายเทได้และมีความลึก 72.5-106.5 เซนติเมตร pH ของน้ำ 7.45 และงอกงามดีเมื่อไม่มีวัชพืชน้ำปะปน (จารีย์,2519) จากการศึกษาของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วาสนา (2527) พบว่ามีหลายพันธุ์และหลายชื่อซึ่งอาจแยกออกตามลักษณะรูปร่างและสีของดอกได้ 6 พันธุ์ คือ

พันธุ์ที่ 1 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ปลายเรียว ดอกสีชมพู มีชื่อว่า บัวหลวงชมพู ปทุม ปัทมา หรือโกกระณต

พันธุ์ที่ 2 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 1 ดอกสีขาว มีชื่อว่า บัวหลวงขาว บุณฑริก หรือปุณฑริก

พันธุ์ที่ 3 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ป้อม ดอกสีชมพู มีชื่อว่า บัวหลวงชมพูซ้อน สัตตบงกช หรือ บัวฉัตรชมพู

พันธุ์ที่ 4 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 3 สีขาว มีชื่อว่า บัวหลวงขาวซ้อน สัตตบุษย์ หรือบัวฉัตรขาว

พันธุ์ที่ 5 ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 1 ดอกสีขาว มีชื่อว่า บัวเข็มขาว บัวปักกิ่งขาว หรือบัวหลวงจีนขาว

พันธุ์ที่ 6 ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 5 ดอกสีชมพู มีชื่อว่า บัวเข็มชมพู บัวปักกิ่งชมพู หรือบัวหลวงจีนชมพู

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง

ใบ มีสีเขียวอมเทา ใบค่อนข้างกลมคล้ายจาน ขอบใบยก ผิวใบด้านบนมีขนอ่อนๆเล็กน้อย เป็นนวลเหมือนนวลใบตองเคลือบอยู่ด้านบนของใบ ทำให้เมื่อโดนน้ำจะไม่เปียกน้ำ เมื่อใบยังอ่อนหรือเป็นต้นอ่อนใบจะลอยปริ่มน้ำ ส่วนใบที่แก่แล้วจะชูพ้นน้ำ ใบมีขนาดใหญ่

ดอก สีของดอกที่พบทั่วไปส่วนมากมี 2 สี คือสีชมพูและสีขาว ลักษณะของกลีบดอกจะมีทั้งซ้อนและดอกรา ดอกซ้อนคือดอกที่มีกลีบซ้อนกันหลายชั้น ส่วนดอกราจะมีกลีบดอกชั้นเดียว ลักษณะของดอกที่กำลังตูมจะมีทั้งดอกแหลมและดอกป้อม

กลีบเลี้ยง,กลีบดอก กลีบเลี้ยงมี 46 กลีบ ลักษณะคล้ายกับกลีบดอก ส่วนกลีบดอกมีลักษณะโคนกลีบดอกกว้าง ปลายกลีบดอกเรียวโค้งงุ้มเข้าด้านใน กลีบดอกจะเป็นเส้นเรียงเป็นแนวยาวไปตามความยาวกลีบ

เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย เกสรตัวเมียมีรูปร่างลักษณะคล้ายกรวยหงายปลายตัด ภายในจะเป็นช่องว่างของรังไข่ มียอดของเกสรตัวเมียเรียงรายเป็นวงอยู่บนหน้าตัดของกรวยนี้จำนวน 5-15 อัน ส่วนเกสรตัวผู้มีจำนวนมาก บางพันธุ์มีลักษณะคล้ายกลีบดอกโดยมีส่วนปลายเป็นก้านชู และอับเกสรตัวผู้เรียงล้อมส่วนฐานของรังไข่

ผลและเมล็ด ผลเป็นกลุ่มซึ่งมักเรียกว่า ฝัก ประกอบด้วยผลย่อย มีเปลือกหนาสีเขียว ด้านในสีขาวพอแก่เปลือกเป็นสีดำและแข็ง เรียกว่า เมล็ดบัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิสัยการเจริญเติบโต หลังจากเมล็ดงอกจะเจริญเติบโตด้วยไหล (stolon) ชอนไชไปใต้ผิวดิน สามารถแตกต้นใหม่จากข้อขึ้นเป็นต้นใหม่ ไหลเดิมและไหลใหม่ที่แตกจากข้อจะเจริญชอนไชไปใต้ดินแตกเป็นต้นใหม่เรื่อยๆไป ถ้าเกิดในทุ่งนา ห้วย หนอง คลอง บึง ไหลจะไม่ขาดจะเจริญทางกว้างและเปลี่ยนสภาพเป็นเหง้า (rhizome) ฝังจมอยู่ใต้ดินเหมือนตาข่ายใยแมงมุม ถ้าน้ำแห้งเหง้านี้จะไม่ตายเมื่อถึงฤดูฝนมีน้ำมา จะแตกใหม่เจริญเติบโตต่อไป

ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

วาสนา (2527) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ดังนี้

ลำต้น ลำต้นอยู่ในดินใต้น้ำเรียกว่า เหง้า อยู่ในดินลึกประมาณ 5-15 เซนติเมตร ลำต้นอ่อนมีสีขาว หรือค่อนข้างแดงมีจุดประปราย เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีจุดสีน้ำตาล ปล้องรูปทรงกระบอกยาว 3.0-4.5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง0.25-3.60 เซนติเมตร ตรงข้อมีตา ที่ให้กำเนิดใบและดอก ส่วนล่างมีราก ในลำต้นมีน้ำยางสีขาวขุ่น

ราก เป็นระบบรากฝอย เกิดตรงบริเวณส่วนข้อของลำต้น รากอ่อนมีสีขาว และหมวกรากใหญ่ เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ใบ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกจากข้อตั้งตรงชูขึ้นมาเหนือน้ำ โดยจะอยู่ที่ผิวน้ำและชูใบเหนือน้ำหลายระดับ ใบมีรูปร่างเกือบกลม (sufborbicular) เป็นแบบ Peltate leaf มีส่วนที่เว้าเข้ามาตรงข้ามกันที่ขอบใบ 2 ตำแหน่ง ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้มผิวใบด้านล่างสีเขียวอ่อนกว่า เส้นใบแตกออกจากจุดกึ่งกลางใบ แบบ Palmately Netted Venation ก้านใบแข็งมีหนามสั้นๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปราย และจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านใบ โดยทั่วไปก้านใบสีเขียวแต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำจะมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสีขาวเมื่อถูกกับอากาศแล้วจะเหนียวเป็นเส้น ก้านใบติดกับตัวใบตรงกลางทางด้านล่างของใบ

ดอก เป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่สีขาว สมบูรณ์เพศ มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ดอกออกตรงข้อของลำต้นใต้ดินคู่กับใบแล้วส่งดอกขึ้นมาอยู่เหนือน้ำ ดอกมีขนาดใหญ่ ขณะที่ดอกตูมจะมีลักษณะเป็นรูปไข่ปลายเรียว เมื่อบานมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13-18.5 เซนติเมตร กลีบดอกมี 4-5 กลีบ เรียงตัวเป็น 2 ชั้น สับหว่างกัน ด้านนอกของกลีบมีสีขาวปนเขียว ส่วนด้านล่างมีสีจางลง เส้นบนกลีบดอกมีขนาดใกล้เคียงกันมากและมีจำนวนมากแต่ไม่นูนเด่นชัด กลีบดอกมีรูปร่างโค้งป่องตรงกลาง กลีบในมี 12-14 กลีบ เรียงตัวเป็นชั้นประมาณ 8 ชั้น โดยรอบของฐานรองดอกกลีบในชั้นนอกและชั้นในมีขนาดเล็กกว่าชั้นกลาง ด้านนอกของกลีบจะมีสีเหลืองปนเขียว ด้านในมีสีอ่อนกว่าเห็นเส้นบนกลีบมีสีขาว และมีขนาดใกล้เคียงกันเป็นจำนวนมาก ชั้นที่อยู่ตรงกลางจะมีขนาดใหญ่ที่สุด แต่รูปร่างรูปไข่แต่มีส่วนกว้างอยู่ด้านบน (Obovate) เห็นเส้นบนกลีบในชัดเจนมีประมาณ 5 เส้น มีสีขาวนวลโดยตลอด ทั้งด้านนอกและด้านในยกเว้นส่วนที่ติดกับฐานรองดอกมีสีเหลือง เกสรตัวผู้มี 90-117 อัน อยู่เหนือกลีบชั้นใน ก้านเกสรตัวผู้เรียวเล็ก มีสีเหลืองนวลตอนบนมีอับเรณูสีเหลืองสด ติด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามความยาวของแกนเหนืออับเรณูขึ้นไปมีส่วนปลายสีขาว ขุ่น รูปร่างเรียวเล็กที่ฐานและใหญ่ที่ส่วนปลาย ความยาวของส่วนปลาย 0.25-0.30 เซนติเมตร เกสรตัวผู้มีกลิ่นหอม เกสรตัวเมียมีรังไข่อยู่สูงกว่าเกสรตัวผู้ มีสีเหลืองนวล มีผนังหนาฝังอยู่ส่วนบนของฐานรองดอกมีลักษณะรูปกรวยและมีสีเหลือง ก้านชูเกสรตัวเมียสั้น ยอดเกสรตัวเมียแบนกลม สีเหลืองเป็นมัน แข็ง ในดอกหนึ่งจะมี carpel15-30 อัน และอยู่กระจายไม่ติดกัน ภายในแต่ละรังไข่จะมีไข่อยู่ 1 อัน (จารีย์,2519) ก้านดอกแข็งเหมือนก้านใบคือ ก้านดอกแข็งมีหนามสั้นๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปรายและจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านดอก โดยทั่วไปก้านดอกมีสีเขียว แต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสีขาว เมื่อถูกกับอากาศแล้วจะเหนียวเป็นเส้น

กลีบเลี้ยง ลักษณะเป็นรูปไข่รี เหี่ยว และร่วงง่าย แต่บางครั้งก็อยู่จนติดเป็นผล กลีบเลี้ยงและกลีบดอกรูปร่างคล้ายกันมากแยกจากกันได้ยาก กลีบเลี้ยงจะมีสีขาวอมเขียว

ผล เป็นผลกลุ่ม (Aggregate Fruit) มักเรียกว่า ฝัก ประกอบด้วยผลย่อยๆ เมื่ออ่อนเปลือกหนาสีเขียว ด้านในสีขาว พอแก่เปลือกเป็นสีดำและแข็ง ผลอ่อนแต่ละผลเป็นแบบ Nut มักเรียกว่าเมล็ดบัว

เมล็ด มีเปลือกหุ้มบางสีขาว อ่อนนุ่ม ภายในมีใบเลี้ยงหนา มีสีขาวนวล 2 ใบ ไม่มี Endosperm (Exalbuminous Seed) ต้นอ่อนมีสีเขียวเข้มมักเรียกกันว่า ดีบัว

บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว

บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกนั้นมีชื่อที่ใช้เรียกกันโดยทั่วไปหลายชื่อเช่น บัวหลวงขาว ปุณฑริก บัวแหลมแก้ว บัวหลวงแหลมแก้วที่เกษตรกรนาบัว อำเภอศาลายา จังหวัดนครปฐม เรียกบัวหลวงสีขาวกลีบไม่ซ้อน แต่จะมีสีเขียวมากกว่าบัวหลวงบุณฑริก ซึ่งในปัจจุบันเกษตรกรไม่ปลูกแล้ว เนื่องจากมีลักษณะที่ไม่ตรงกับความต้องการของตลาด บัวหลวงแหลมแก้วนี้อาจเกิดจาก variationที่กลายมาจากบัวหลวงบุณฑริกเนื่องจากมีลักษณะภายนอกทางสันฐานวิทยาที่คล้ายกัน

บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม

จากการเก็บตัวอย่างบัวหลวงและการเก็บเมล็ดเพื่อนำมาศึกษาโดยนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เกษตรกรนาบัว อำเภอศาลายา จังหวัดนครปฐม ได้ให้เมล็ดพันธุ์ของบัวหลวงชนิดหนึ่งซึ่งเกษตรกรกล่าวว่าเป็นบัวหลวงพันธุ์กลาย ซึ่งจากลักษณะทางสันฐานวิทยานั้นมีลักษณะเป็นบัวหลวงสีขาวแต่มีกลีบกึ่งซ้อน คือมีลักษณะกลีบดอกกึ่งกลางระหว่างพันธุ์สัตตบุษย์และบุณฑริก จึงได้เก็บตัวอย่างของเมล็ดเพื่อนำมาศึกษาถึงลักษณะประจำพันธุ์ โดยวิธีการจำแนกไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การขยายพันธุ์ของบัวหลวง

การขยายพันธุ์ของบัวหลวง (เสริมลาภ,2526; คณิตาและคณะ,2536) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี ดังนี้คือ

1. การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Reproductive propagation)

เป็นวิธีที่จะทำให้ได้พันธุ์แปลกใหม่ขึ้นหลายพันธุ์ โดยธรรมชาติแล้วบัวหลวงจัดเป็นพืชผสมข้ามทั้งนี้เพราะเกสรตัวผู้จะแก่พร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้ในวันที่สองหลังจากดอกเริ่มบาน ซึ่งในธรรมชาติแล้วจะมีแมลงและลมช่วยในการผสมเกสรอยู่แล้ว วิธีการปลูกด้วยเมล็ดสามารถทำได้โดย

- เตรียมดินเหนียวที่ไม่มีรากหรือวัชพืชปนอยู่ ใส่ดินลงในภาชนะที่มีความลึกสามารถบรรจุดินได้สูงอย่างน้อย 10 เซนติเมตร และเติมน้ำให้สูงจากพื้นดินประมาณ 15 เซนติเมตร ส่วนขนาดความกว้างของปากภาชนะขึ้นอยู่กับปริมาณเม็ดบัวที่ใช้เพาะ
- เติมน้ำลงในภาชนะที่ใส่ดิน ขยำดินให้เหลวเป็นเนื้อเดียวกัน กดปรับดินให้แน่นและเรียบ แล้วเติมน้ำให้สูงจากผิวดิน 7-8 เซนติเมตร
- นำเมล็ดบัวหลวงที่จะใช้ปลูกกดลงให้จมดิน ค่อยเติมน้ำให้สูงจากผิวดินประมาณ 15 เซนติเมตร
- นำภาชนะที่เพาะไปวางในบริเวณที่ถูกแดดในช่วงเช้า หรืออาจได้รับแดดในช่วงบ่ายได้เล็กน้อยไม่ควรให้ได้รับแดดทั้งวัน เพราะจะทำให้น้ำร้อนมาก เมล็ดและต้นที่งอกอาจตายได้

หลังจากนั้น 1 เดือน เมล็ดบัวที่สมบูรณ์จะออกเป็นต้นเตี้ยๆ แล้วแตกใบลอยขึ้นเหนือน้ำตั้งแต่ 2 ใบขึ้นไป จึงย้ายปลูกในกระถาง

<u>ข้อควรระวัง</u>

อย่าย้ายลงในกระถางปลูกที่มีขนาดใหญ่มากเพราะอาจทำให้น้ำมีฤทธิ์กรดด่างสูงเกินไป ซึ่งอาจทำให้กล้าบัวตาย และระหว่างรอการปลูกควรเก็บในที่ชื้นเพราะถ้ามีส่วนใดของต้นแห้งต้นจะแห้งตายทันที

2. การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Vegetative propagation)

เป็นวิธีการที่นิยมกันมากเนื่องจากสะดวกและรวดเร็ว สามารถทำได้ง่ายโดยการตัดแยกต้นอ่อนที่เจริญขึ้นมาใหม่ จากส่วนของลำต้นของต้นแม่ที่ใช้เป็นส่วนในการขยายพันธุ์มีดังนี้

2.1 การขยายพันธุ์จากส่วนของไหล (stolon) แยกไหลที่กำลังแตกยอดเจริญอย่างน้อย 2 ข้อมาปลูก โดยทำร่องลึกประมาณ 3-4 เซนติเมตร ตามแนวยาวของไหลในภาชนะปลูกแล้ววางไหลในแนวร่อง กลบไหลและข้อแต่ให้ยอดเจริญโผล่พ้นดินเพราะถ้ายอดอยู่ใต้ดินจะตาย วิธีการป้องกันไหลลอยคือ ใช้กิ่งไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไผ่สดขนาดเท่าตะเกียบ ยาวประมาณ 18 เซนติเมตร หักพับไม่ให้ขาดเสียบค่อมทับไหลบัวที่ข้อฝังอยู่ในโคลนแต่ไหลที่แยกจากต้นแม่ควรมีใบผลิลอยเหนือน้ำ 2-3 ใบ ในระยะนี้สามารถตัดแยกไหลนำไปขยายพันธุ์ได้

2.2 การขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของเหง้า (rhizome) เหง้าจัดเป็นส่วนของลำต้นที่ฝังอยู่ใต้ผิวดิน การเจริญเติบโตของเหง้าจะเจริญทั้งแนวนอนใต้ผิวดิน และขยายออกรอบทิศ เมื่อเหง้าแก่จะขยายออก และมีการสะสมอาหารหลังจากนั้นตาก็จะแตกออกเป็นต้นเจริญขึ้น ให้ตัดเหง้าที่ต้นอ่อนเจริญขึ้นมาโดยให้มีส่วนของเหง้าเดิมติดไป 2-3 นิ้ว เหง้าเดิมที่ตัดไปจะมีอาหารสะสมไว้เหลือ เพื่อสำหรับการสร้างใบและรากเจริญเป็นต้นใหม่

การศึกษาลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Genetic variation) ของสิ่งมีชีวิตสามารถศึกษาได้จากการทำงานของเอนไซม์ ในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพราะเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งนั้นเป็นผลจากการทำงานของยีนโดยวิธีการสังเคราะห์โปรตีน โดยพบว่าเอนไซม์บางชนิดประกอบด้วยโปรตีนที่มีรูปร่างโมเลกุลแตกต่างกัน แต่สามารถเร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตเดียวกันได้ เรียกว่า ไอโซไซม์

ไอโซไซม์ (Isozyme) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง องค์ประกอบของสารทั้งสองชนิดถูกควบคุมด้วยยีน ซึ่งยีนเป็นตัวการสำคัญในการกำหนดลักษณะทางพันธุกรรม จากคุณสมบัตินี้เองจึงมีความพยายามสกัดแยกเอนไซม์หรือไอโซไซม์ ออกมาตรวจสอบลักษณะซึ่งถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมของสายพันธุ์พืชแต่ละชนิด

Isozyme คือเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่มียีนต้นแบบมากกว่า 1 ยีน ทำให้มีโมเลกุลที่ต่างกัน (เนื่องจากการเรียงตัวของ subunit ที่ต่างกัน) หรือเอนไซม์เดียวกันแต่ต่างรูป ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน คุณสมบัติทางไฟฟ้าและโครงสร้างจะต่างกันในปฏิกิริยาทางเคมีแบบเดียวกัน เอนไซม์ต่างๆ สามารถสกัดได้จากส่วนต่างๆ ของพืชโดยอาศัยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) ซึ่งสามารถศึกษาตรวจสอบความสัมพันธ์ได้จากแบบของไอโซไซม์ (Isozyme pattern) ทั้งนี้เอนไซม์หลายชนิดซึ่งถูกสร้างขึ้นแล้วอาจเกิดขบวนการทางเคมีบางอย่างเช่น methylation หรือ phosphorylation ทำให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะ sidechain ของกรดอะมิโนในโมเลกุลของเอนไซม์ระหว่างการเจริญเติบโตหรือกระบวนการต่างๆ ทางชีวเคมีได้ (ชวน พิศ,2538)

ความแตกต่าง ความเหมือนหรือความคล้ายคลึงของเอนไซม์จะเป็นตัวบ่งชี้ความใกล้ชิดหรือความแตกต่างกันทางพันธุกรรม พืชที่มีแบบแผนของการเรียงของแถบไอโซไซม์เหมือนกันก็จะมีสายพันธุ์เดียวกัน แต่ถ้ามีข้อแตกต่างกันแสดงว่าพืชชนิดนั้นมีสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามความแตกต่างกันนี้อาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ทำให้ขบวนการทางชีวเคมีที่สร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์หรือไอโซไซม์แตกต่างกันได้ ปัจจุบันการตรวจสอบโดยใช้วิธีการอิเลคโทรโฟรีซีส กำลังเป็นที่นิยมเพราะทำได้ไม่ยาก สะดวกรวดเร็วและให้ผลที่ไม่เบี่ยงเบน (เสาวณี,2538)

Electrophoresis หรือ Zone electrophoresis คือเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซีสชนิดหนึ่งซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน สำหรับแยกสารตัวอย่างให้มีความบริสุทธิ์ ตรวจวิเคราะห์สารผสม โดยเฉพาะเอนไซม์และโปรตีนเพื่อการจำแนกสายพันธุ์พืช หลักการโดยทั่วไปคือ การหยดสารตัวอย่างลงในสสารตัวกลางกึ่งแข็ง เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าลงในตัวกลางซึ่งแช่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ โมเลกุลสารตัวอย่างที่สกัดแล้วจะเคลื่อนที่บนตัวกลางดังกล่าว ตามชนิด ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลสาร เกิดเป็นแถบ (band หรือ zone) สารตัวกลางที่ใช้เป็นสารช่วยลดการรบกวนจากสภาพภายนอกแก่สารตัวอย่างได้

Gel electrophoresis เป็นแบบที่มีสารตัวกลางจำพวกเจลหรือสารกึ่งแข็ง ได้แก่ แป้ง (starch) อะกาโรส (agarose) โพลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของสารผสมระหว่าง acrylamide กับ N,N-methylenebisacrylamide (cross linking) การแยกของโมเลกุลสารจะอาศัยสภาพของเนื้อเจล และขนาดของเนื้อเจล (poresize) ที่เตรียมให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยทั่วไปความเข้มข้นของตัวเจลจะอยู่ระหว่าง 2-20% ในอดีต gel electrophoresis ที่นำมาใช้ในงานไอโซไซม์ส่วนใหญ่เป็น starch gel ซึ่งเหมาะสมในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ แต่บางครั้งขนาดของตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเอนไซม์มีข้อจำกัดทำให้ผลที่ได้ไม่ชัดเจน จึงทำให้มีการนำ polyacrylamide gel มาแทนที่เนื่องจากสามารถคุมขนาดของช่องเนื้อเจลได้ โดยกำหนดความเข้มข้นของเจล นอกจากจะให้ประสิทธิภาพในด้านการแยกโปรตีนแล้วยังสามารถใช้กับโมเลกุลขนาดเล็กอย่าง RNA และชิ้นส่วนของ DNA การเตรียมเจลทำได้ทั้งในรูปของ column gel เจลแผ่น (slab gel) จัดเป็นระบบอิเลคโทรโฟรีซีสในแนวดิ่ง (vertical type) ซึ่งเหมาะสมกับการแยกเอนไซม์และโปรตีนของสารตัวอย่าง สำหรับอิเลคโทรโฟรีซีสในแนวราบ (horizontal type) มักเป็นเจลแบบแผ่นนิยมใช้แยก DNA RNA หรือกรดนิวคลีอิก

Disc electrophoresis ถือได้ว่าเป็นเทคนิค Zone electrophoresis ที่ใช้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์และจำแนกชนิดของโปรตีนที่ปะปนกันอยู่ได้อย่างละเอียด ทำให้ได้แถบสีที่คมชัดที่สุด คำว่า disc หมายถึง ระบบอิเลคโทรโฟรีซีสที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ ที่มี pH discontinuity และ volate discontinuity หลักการของระบบนี้เป็นการเตรียมเจลของคอลัมน์แนวดิ่งหรือเป็นแผ่นโดยจะแบ่งเป็น 3 ส่วน คือชั้นตัวอย่าง (sample gel or sample) อยู่บนสุดรองลงมาคือ stacking gel หรือ spacer gel ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเจลต่ำ (3-5%) ส่วนชั้นล่างสุดเรียกว่า separating gel หรือ running gel ซึ่งมีความเข้มข้นของเจลสูงขึ้น (7.5-12.5%) ชั้นบนและชั้นล่างจะมีขนาดช่องของเนื้อเจลใหญ่กว่าชั้นล่างสุดเนื่องจากการผสมของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำกว่าทำให้โมเลกุลของตัวอย่างที่หย่อนในช่องเจลเคลื่อนที่ได้เร็ว สนามไฟฟ้าที่มีแรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงสามารถผลักตัวเองให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคลื่อนที่ได้เร็วในบริเวณ stacking gel ตัวอย่างสามารถรวมอยู่ระหว่างรอยต่อของ stacking gel และ separating gel ได้มาก การเคลื่อนที่ของโมเลกุลในส่วนของ separating gel จะช้าลงเนื่องจากขนาดช่องของเนื้อเจลมีขนาดเล็กลงทำให้สามารถแยกความบริสุทธิ์ของโปรตีนและเอนไซม์เป็นแถบๆ เมื่อทำปฏิกริยาสีย้อมจึงเห็นเป็นแถบสีที่คมชัดต่อไป

อิเลคโทรโฟรีซิส แบบ โพลิอะคีลาไมด์เจล (Polyacelamide Gel Electropholysis, PAGE) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารละลายโปรตีนผสมเป็นเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิสที่มีตัวกลางค้ำจุนเป็นโพลิอะคีลาไมด์เจลซึ่งเฉื่อยต่อสารเคมีในระหว่างเกิดกระบวนการแยก ซึ่งเทคนิค PAGE ขนาดรูพรุนของเจลที่เหมาะสมมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดใหญ่ช้าลงกว่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดเล็กกว่าทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกจากกันได้ (อาภัสรา,2537)

การวิเคราะห์สายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ ประสบความสำเร็จสูงเนื่องจากพืชชนิดหนึ่งนั้นจะแสดงไอโซไซม์หลายรูปแบบ แต่ในสายพันธุ์เดียวกันจะแสดงรูปแบบเฉพาะตัวมีพืชหลายชนิดที่ได้รับการแยกสายพันธุ์โดยวิธีไอโซไซม์และประสบความสำเร็จ (ชุติมา,2538) ปนัดดาและเกศิณี (2541) ได้ทำการจำแนกพันธุ์ลำไยจำนวน 16 พันธุ์ คือ พื้นเมืองลำพูน กระดูก ชมพูน้ำ ชมพู สร้อยทอง ใบหด เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ แดงกลม น้ำผึ้ง เบี้ยวเขียวป่าเส้า แห้ว พวงทอง อีเหลือง เขียวพระอินทร์ ใบดำ พื้นเมืองน่าน และพันธุ์ดอ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ ดอดอนไชย ดอยอดแดง ดอยอดขาว ดอหอม ดอก้านแข็ง ดอก้านอ่อน ดอน่าน ดอทาน้อย พบว่า วิธีอิเลคโทรโฟรีซิสสามารถใช้จำแนกพันธุ์ลำไยได้ โดยการสกัดไอโซไซม์จากใบแก่ลำไยด้วย การสกัด 0.05 M Tris-HCl buffer,pH 8.4 (150 mM NaCl, cysteine, 1 mM ascrorbic acid, 1mM $CaCl_2$, 1 mM Na_2EDTA, 2% nicotine) ใช้โพลิอะคีลาไมด์เจลเข้มข้น 8.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไอโซไซด์ peroxidase และโพลิอะคีลาไมด์เจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไอโซไซม์ acid phosphatase , esterase ลำไย 16 พันธุ์ สามารถจำแนกออกจากกันได้ด้วยเอนไซม์ peroxidase , acid phosphatase และ esterase ส่วนลำไยพันธุ์ดอ 8 สายพันธุ์ สามารถจำแนกออกจากกันได้ด้วยเอนไซม์ peroxidase , acid phosphatase รูปแบบของเอนไซม์ที่วิเคราะห์ได้มีจำนวนแถบสีแตกต่างกัน คือ peroxidase , acid phosphatase และ esterase มี 10 ,10 และ 3 แถบ ตามลำดับ

สุภาพและคณะ (2540) การศึกษา Isozyme Peroxidase, Esterase ,Malatate dehydrogenase (MDH) , Catalase และ 6-phosphogluconase (6-PGDH) ในใบทุเรียน clone ต่างๆ จาก 4 พันธุ์ คือ หมอนทอง กระดุมทอง ชะนี และก้านยาว ที่ปลูกในแปลงทดสอบ clone ของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรีด้วย วิธี Polyacrylamide gel electrophoresis ชนิดแผ่น (slab gel) ผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบ activity ของ enzyme ได้ 4 ระบบ คือ Peroxidase, Esterase, MDH และ 6-PGDH แต่พบว่ามีเพียง peroxidase เท่านั้นที่มีแถบของเอนไซม์ที่บ่งชี้ให้เห็นความแตกต่างกันของพันธุ์ สำหรับแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละ clone ในพันธุ์เดียวกันนั้นพบว่ามีความแตกต่างของแถบเอนไซม์มีทั้งระหว่าง clone และระหว่างต้นภายใน clone เดียวกัน

Joanne (1998) ศึกษาถึงความแปรปรวนของไอโซไซม์ใน *Calliandra calothyrsus* เกี่ยวกับพันธุ์ที่จำกัดเขต การเก็บรักษา และรูปแบบที่แตกต่างกันภายในและระหว่างสายพันธุ์ของ *Calliandra calothyrsus* มีพันธุ์ที่แพร่หลายในอเมริกากลางและเม็กซิโกตอนใต้ ซึ่งมีการข้ามสายพันธุ์โดยธรรมชาติ มีสัณฐานวิทยา และนิเวศน์วิทยาที่แตกต่างกัน การพิจารณาสายพันธุ์ของ *Calliandra calothyrsus* มีการนำมาจากหลายๆพื้นที่ของ tropics พืชชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดที่ Guatemala แต่มีส่วนน้อยที่จะทราบถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมว่าเกิดจากแหล่งที่เกิดหรือธรรมชาติ จาก electrophoresis 23 loci ใน 17 สายพันธุ์ของ *Calliandra calothyrsus* ที่บ่งชี้ว่าส่วนใหญ่ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ (Fst=0.802) และสายพันธุ์ที่เป็น heterozygosites ค่อนข้างต่ำ (mean H_0=0.057) พันธุ์ที่เป็นพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติมีส่วนน้อยที่จะเป็น heterozygosites และส่วนใหญ่เหมือนที่มาจาก Sata Mariada Jesus สายพันธุ์โดยธรรมชาติใน southern Guatemala แบ่งความแตกต่างเป็น 4 กลุ่ม โดยใช้ Nei's genetic distance และ Population Aggreation Analysis (PAA) โดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและนิเวศน์วิทยาเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยความแตกต่างนั้นสามารถสังเกตได้ในแต่ละสายพันธุ์

เพิ่มพงษ์ และคณะ (2529) ได้จำแนกสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจ ซึ่งได้แก่ มะม่วง และข้าว ด้วยรูปแบบของไอโซไซม์ โดยใช้เทคนิควิธีทางอิเลคโทรโฟรีซิส เป็นหลัก ปรากฏว่า ในมะม่วงนั้นสามารถจัดกลุ่มและจำแนกพันธุ์ได้จากส่วนใบมะม่วงด้วยเทคนิคของโพลิอะคริลาไมด์เจล ระบบ anion buffer system และการวิเคราห์โปรตีนอัลบูมินและโกลบูลินในคัพภะข้าว ด้วยเทคนิควิธีของโพลิอะคริลาไมด์เจลระบบ cationic buffer system สามารถใช้จัดกลุ่มและจำแนกพันธุ์ข้าวได้เกือบทั้งหมดในขณะที่ peroxidase และ acid phosphatase ไอโซไซม์มีรูปแบบของเอนไซม์ที่คล้ายคลึงกัน จนไม่สามารถนำมาใช้จำแนกพันธุ์ข้าวได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการแยกเอนไซม์ด้วยเทคนิคทางอิเลคโทรโฟรีซิส แบบ isoeletric focusing gel ที่มีประสิทธิภาพสูงอีกด้วย

เสาวณี (2538) ตรวจวิเคราะห์พันธุ์มะขาม ทั้งเปรี้ยวและหวาน ที่ปลูกจากแหล่งต่างๆ โดยใช้ลักษณะไอโซไซม์ 3 ชนิด คือ peroxides , acid phosphates และ esterase พบว่าลักกษณะแถบสี จำนวนแถบสี และตำแหน่งของแถบสีของ peroxides ที่ปรากฏบนแผ่นเจลสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์พันธุ์มะขามได้ แถบสีที่ปรากฏขึ้นมีความแตกต่างกัน ในมะขามแต่ละพันธุ์ โดยมีไอโซไซม์ peroxides บริสุทธิ์ จากต้น Horseradish เป็นมาตราฐานเปรียบเทียบส่วน ไอโซไซม์ acid phosphates และ esterase แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์น้อยมาก ผลของไอโซไซม์ peroxides ที่ปรากฏขึ้นในแต่ละสายพันธุ์สามารถจำแนกมะขามออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ซึ่งพบว่า พันธุ์มะขามบางพันธุ์ที่เก็บตัวอย่างจากคนละแหล่งนั้น อาจพบว่ามีอยู่หลายกลุ่ม สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเป็นการสับสนในการนำมาปลูกในสภาพแวดล้อมที่ต่างๆกัน ส่วนใหญ่แถบสีเข้มของ ไอโซไซม์ peroxides ไม่เปลี่ยนแปลง สาเหตุอาจเกิดจากการสับสนในชื่อพันธุ์มากกว่าเกิดการกลายพันธุ์

อรวรรณ (2542) ศึกษาไอโซไซม์ในบัวประดับจำนวน 5 พันธุ์ คือ บัวฝรั่ง บัวผันนางกวักสีน้ำเงินคราม บัวสายชมพูซิลอน บัวผันงอกต้นบนใบ และบัวผันยงลาภ ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส ชิ้นส่วนของบัวประดับที่ใช้ คือ ก้านอ่อนและใบอ่อน สารสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) ที่เหมาะสม คือ 0.5 M Tris pH 7.0, 100 mM EDTA ,$MgCl_2$ 1M , 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

การศึกษาทางด้านไอโซไซม์นอกจากจะใช้ส่วนของพืชที่เป็นชิ้นส่วนภายนอก เช่น ก้านใบ ดอก แล้วยังสามารถนำส่วนของพืชที่เป็นเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทำการทดลองได้ด้วยเช่นกัน เพิ่มพงษ์และคณะ (2531) ผลการแยก peroxidase ไอโซไซม์จากเนื้อเยื่อส่วนใบมะละกอ ที่เลี้ยงด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยวิธีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสชนิดแท่ง ที่มีความเข้มข้นของเจล 10 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏว่า จากการใช้ตัวอย่างของเนื้อเยื่อมะละกอเพียง 100 มิลลิกรัม เอนไซม์ที่สกัดได้ เมื่อแยกด้วยเทคนิคทางอิเลคโทรโฟรีซิส โดยใช้ระบบ acidic buffer system พบว่า Zymogram pattern ที่ได้สามารถบ่งบอกพันธุ์และเพศมะละกอได้อย่างชัดเจน ผลการทดลองนี้นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจสอบพันธุ์และเพศของมะละกอ ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ โดยเฉพาะมะละกอสมบูรณ์เพศ ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการขยายพันธุ์ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แทนการพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะช่อดอกของมะละกอ ในระยะที่เจริญเต็มวัยแล้ว

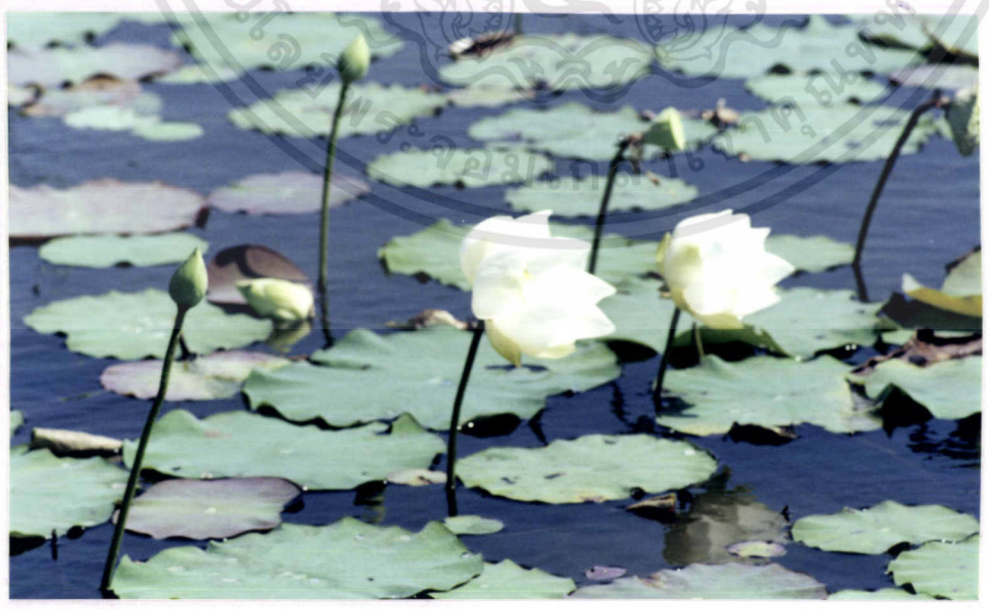
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง ใบอ่อนและก้านอ่อนของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (ภาพที่ 1) พันธุ์แหลมแก้ว (ภาพที่ 2) และพันธุ์ลูกผสม (ภาพที่ 3) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ส่วนเอมบริโอของเมล็ดนำมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ

ภาพที่ 1 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก



ภาพที่ 2 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 โกร่งบดตัวอย่างพืช

2.2 เครื่องอิเลคโทรโฟรีซีส

2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง ที่มีระบบรักษาความเย็น

2.4 เครื่องดูดอากาศ

2.5 micro pipette, pipette

2.6 ถาดหรือกล่องสำหรับย้อมสีเจล

2.7 เครื่องแก้วต่างๆ

3. อุปกรณ์ในการบันทึกผลการทดลอง

3.1 ไม้บรรทัด

3.2 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม

สารเคมี

1. Tris- HCl
2. Glycine
3. β- mercaptoethanol
4. Poly vinylpyrrolidone (PVP)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ใช้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Ethylenediaminetetra- acetic acid (EDTA)
6. $MgCl_2$
7. KCl
8. Acrylamide
9. Ammonium persulphate (APS)
10. N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)
11. α- naphtylacetate
12. β- naphtylacetate
13. O- dianisidine salf
14. Na –acetate
15. $CaCl_2$
16. Fast blue BB
17. Hydrogen peroxide
18. 3- Amino-9-ethylcarbazole
19. N,N- Dimethylformamide
20. Glycerol
21. Bromophenol blue

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดเอนไซม์ (Extraction buffer)
   ในการทดลองนี้เตรียมสารสกัดเอนไซม์ในปริมาณ 50 ml โดยใช้สารเคมีดังนี้

0.1M Tris-HCl pH7.0	0.6057 g
1 mM EDTA	0.146 g
0.5% PVP	0.25 g
2 mM DTT	0.0154 g
10 mM β-mercaptoethanol	0.034 ml หรือ 34μl

2. การเตรียม Sample buffer ซึ่งประกอบด้วย glycerol 50% และ bromophenol blue 0.5%
3. การเตรียม Running buffer ประกอบด้วย 0.025M Tris และ 0.192M Glycine นำไปปรับ pH เท่ากับ 8.3
4. การสกัดเอนไซม์
   4.1 นำตัวอย่างใบอ่อนและก้านอ่อนมาล้างทำความสะอาด ด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้ง และหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 นำตัวอย่างไปบดในโกร่งที่เย็นจัด โดยเติมสารสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) เพื่อให้เอนไซม์ถูกสกัดได้ง่ายขึ้น โดยใช้ในอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างพืชและ extraction buffer เท่ากับ 50 g : 1 ml

4.3 นำตัวอย่างที่บดละเอียดไปปั่นให้ตกตะกอน ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที

4.4 แยกเอาน้ำใสส่วนบนบรรจุใส่ในหลอด ependoft หลอดละ 100 ไมโครลิตร และเติม sample buffer จำนวน 20 ไมโครลิตร

5. การเตรียมแผ่นเจล

5.1 ต่อชุดแผ่นแก้ว สำหรับทำ slap gel ใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลตามความต้องการ (0.75-1.00 มิลลิเมตร)

5.2 เตรียมสารละลายของเจล 10% (separating gel) และสารละลายเจล 7.5% (stacking gel) โดยเตรียมจากการผสมสารต่างๆ ดังนี้

สารเคมี	10% acrylamide gel (Separating gel)	7.5% acrylamide gel (Stacking gel)
น้ำกลั่น	4.8 ml	2.7 ml
30% acrylamide	3.3 ml	0.75 ml
3M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml	-
0.5M Tris-HCl pH 6.8	-	1.25 ml
APS 1.5%	0.5 ml	0.25 ml
TEMED	15 µl	10 µl

5.3 ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ยกเว้น APS และ TEMED นำไปดูดอากาศ โดยใช้ปั๊มความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ดูดอากาศนานประมาณ 20 นาที

5.4 นำสารละลายเจล 10% (separating gel) ที่ดูดอากาศแล้วมาเติม APS และ TEMED เทสารละลายเจลใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้จากนั้นค่อยๆหยดน้ำกลั่นเพื่อรักษาระดับผิวหน้าของเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30 นาที จึงดูดน้ำออก

5.5 นำสารละลายเจล 7.5% (stacking gel) ที่ดูดอากาศแล้วมาเติม APS และ TEMED เทสารละลายเจลลงบน separating gel สอด comb ลงในเจล ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30 นาที

5.6 ดึง comb ออกจาก stacking gel หยอดน้ำกลั่นลงในช่องซึ่งเกิดภายหลังจากการดึง comb ออก เพื่อทำความสะอาดช่อง หลังจากนั้นดูดน้ำกลั่นออกจนเห็นช่องว่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6 การแยกเอนไซม์

6.1 นำแผ่นเจลที่เตรียมไว้ใส่ลงใน electrophoresis chamber ที่มีสารละลาย Running buffer pH 8.3 buffer ที่เย็น

6.2 ใส่สารตัวอย่างลงในหลุม (ช่องว่างที่ดึงหวีออกแล้ว) หลุมละ 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร) เสร็จแล้วปิดฝาครอบ ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ที่ 15 mA 150V เมื่อสารมีลักษณะเป็นเส้นแถบจึงเปลี่ยนมาเป็น 25 mA นานประมาณ 1-2 ชั่วโมง

7. การย้อมเอนไซม์

การย้อมเอนไซม์ ทำโดยนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ ในการทดลองเอนไซม์ที่ใช้ย้อมแผ่นเจลมีดังนี้

7.1 Esterase (EST)

- Tris- HCl 0.1 M pH 7.0	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 นาทีจนปรากฏแถบสีเทาดำ หรือสีดำ จึงนำ gel ไปล้างน้ำ

7.2 Peroxidase (PEX)

- 50mM Na- acetate pH 5.0	25 ml
- $CaCl_2$	25 mg
- Hydrogen peroxide 3%	0.125 ml
- 3- Amino-9- ethylcabazole	12.5 mg
- N,N- Dimethylformamide	1.0 ml

นำ gel ไป incubate ในที่มืดอุณหภูมิ 37°C จนปรากฏแถบสีน้ำตาล จึงนำเจลไปล้างน้ำ

8. การอ่านผลการทดลอง

นำแผ่นเจลไปบันทึกภาพ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบเอนไซม์ต่างๆ ที่เกิดขึ้น และวัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration : Rf)ซึ่งวัดได้จาก

Rf = ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากจุดเริ่มต้น

ระยะทางการเคลื่อนที่ของ tracking dye จากจุดเริ่มต้น

เพื่อนำไปเขียน zymogram

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

41679

วันและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง ตุลาคม 2543

สิ้นสุดการทดลอง มกราคม 2544

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

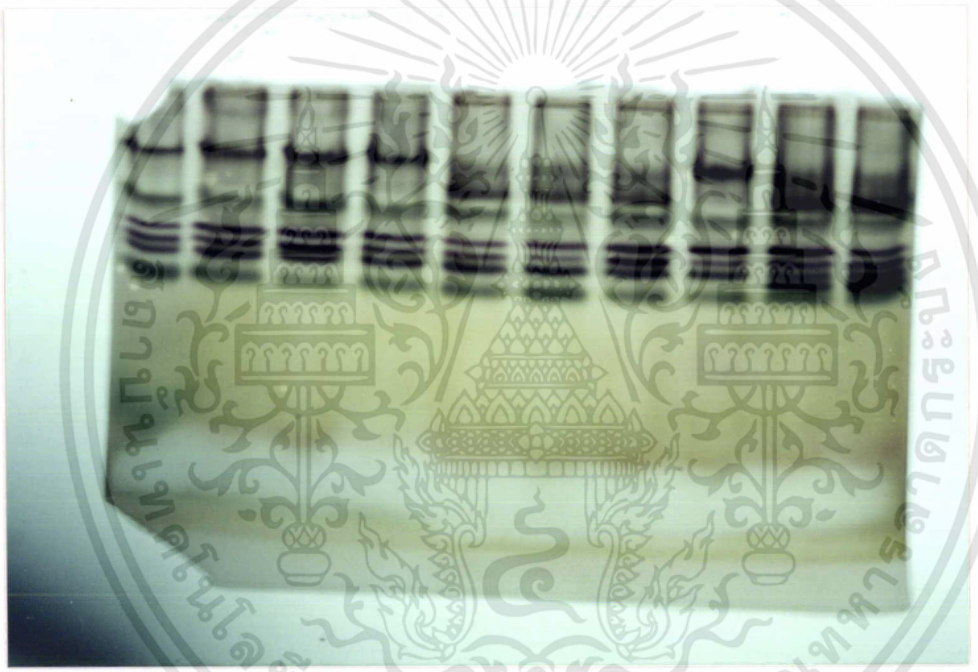
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

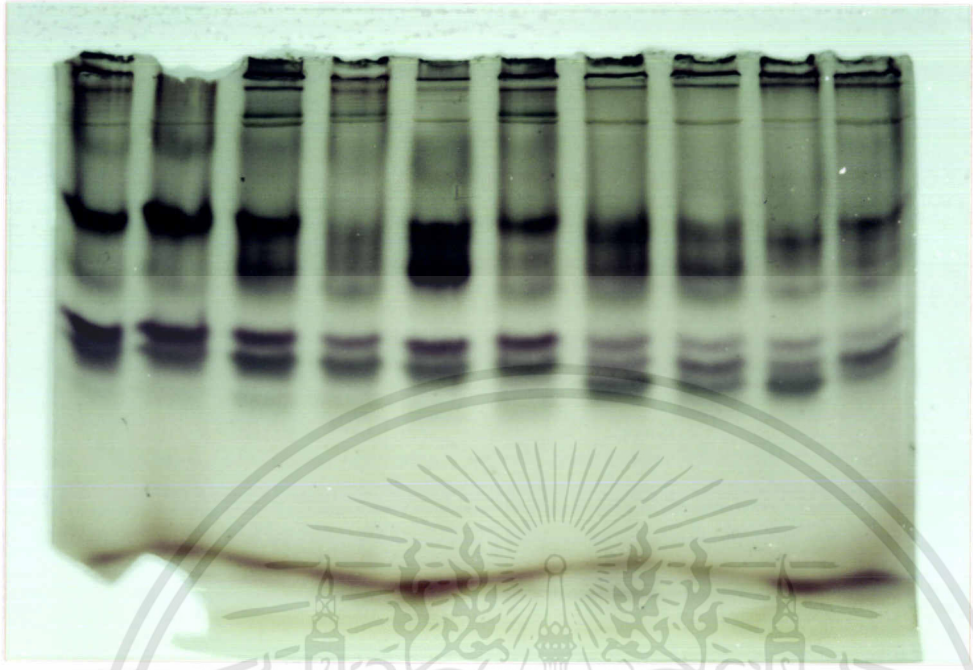
จากการศึกษา Isozyme ของบัวหลวงจำนวน 3 พันธุ์ คือ บุณฑริก แหลมแก้ว พันธุ์กลาย โดยการนำเอาส่วนของใบอ่อนและก้านอ่อนของบัวหลวงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ส่วนเอมบริโอจากเมล็ดทั้ง 3 พันธุ์ ใช้สารสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.0 ,1mM EDTA, 0.5% PVP, 2mM DTT, 10mM β-mercaptoethanol จากการตรวจดู activity ของ Isozyme จำนวน 2 ระบบ ได้แก่ EST และ PEX

จากการทดลองในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม พันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง ได้แสดงรูปแบบไอโซไซม์ EST ที่แตกต่างกันดังภาพที่ 4

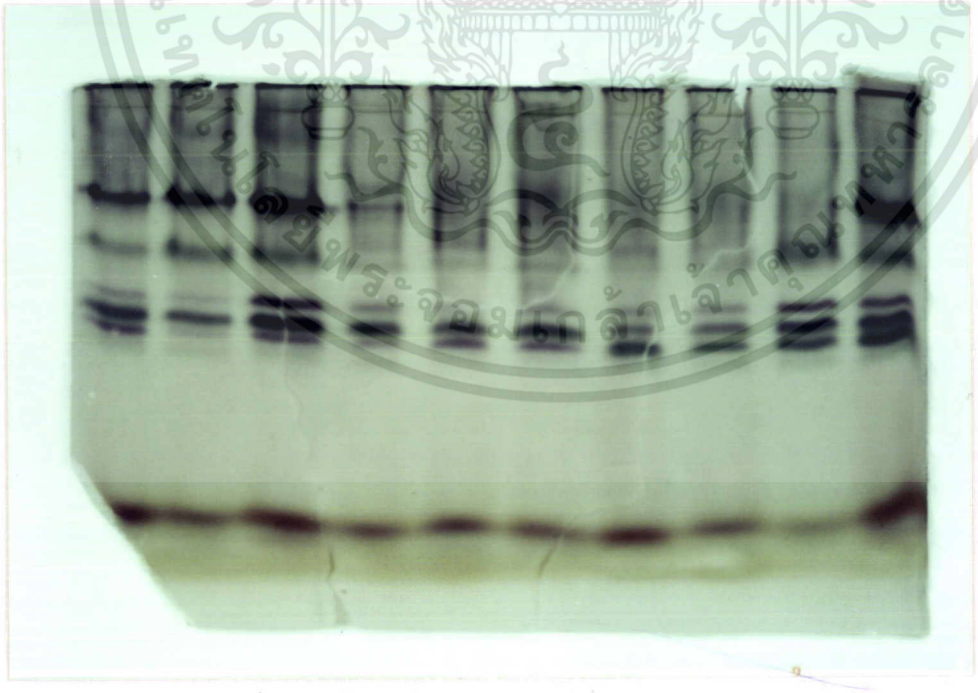


ภาพที่ 4a ตัวอย่างที่ 1-4 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ตัวอย่างที่ 5-8 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว
ตัวอย่างที่ 9-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

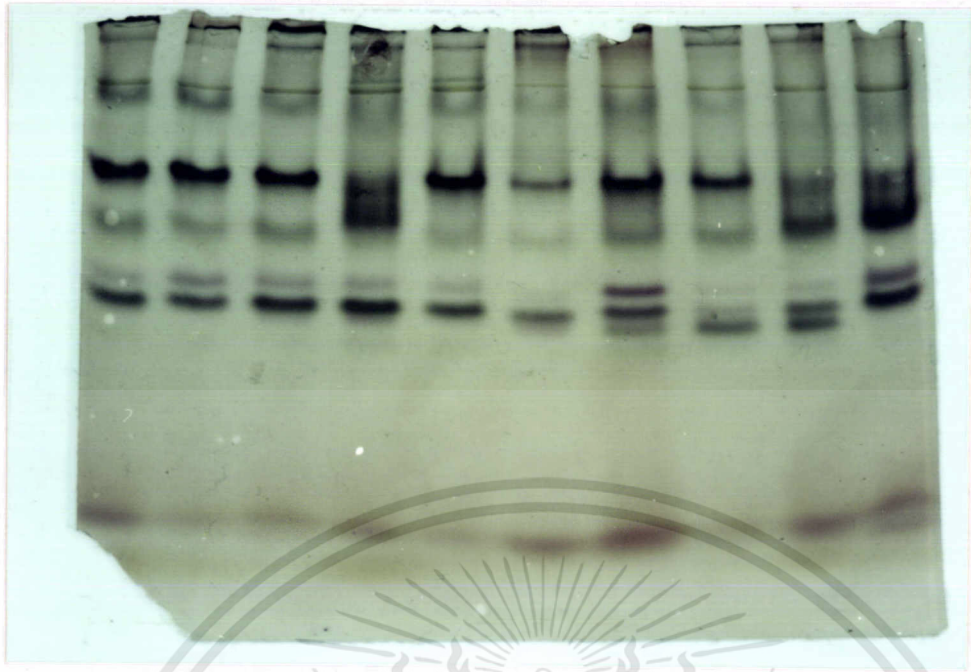


ภาพที่ 4b ตัวอย่างที่ 1-2 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ตัวอย่างที่ 3-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว
ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม



ภาพที่ 4c ตัวอย่างที่ 1-3 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ตัวอย่างที่ 4-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว
ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4d ตัวอย่างที่ 1-3 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ตัวอย่างที่ 4-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว
ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม

รูปแบบไอโซไซม์ EST ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม มีรูปแบบที่ปรากฏทั้งหมด 7 รูปแบบ นำมาเขียน zymogram ได้ดังภาพที่ 5

ภาพที่ 5 แสดงรูปแบบไอโซไซม์ EST 7 แบบในบัวหลวงบุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบที่ 1 มี 6 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.18, 0.32, 0.4, 0.43, 0.45 และ 0.46 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) จากตัวอย่างบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์ พันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง บุณฑริกมีจำนวน 15 ต้น แหลมแก้วมีจำนวน 3 ต้น และลูกผสมมีจำนวน 2 ต้น ที่มีรูปแบบไอโซไซม์ EST แบบที่ 1 (ตารางที่ 1)

รูปแบบที่ 2 มี 6 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.24, 0.32, 0.4, 0.43, 0.45 และ 0.46 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) แหลมแก้วมีจำนวน 7 ต้น ลูกผสมมีจำนวน 7 ต้น ส่วนบุณฑริกไม่มีรูปแบบไอโซไซม์ EST แบบที่ 2 (ตารางที่ 1)

รูปแบบที่ 3 มี 5 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.18, 0.32, 0.4, 0.43 และ 0.45 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) บุณฑริกมีจำนวน 2 ต้น แหลมแก้วมีจำนวน 3 ต้น และลูกผสมมีจำนวน 2 ต้นที่มีรูปแบบไอโซไซม์ EST แบบที่ 3 (ตารางที่ 1)

รูปแบบที่ 4 มี 6 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.18, 0.28, 0.32, 0.4, 0.43 และ 0.45 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) แหลมแก้วมีจำนวน 1 ต้น ลูกผสมมีจำนวน 4 ต้น ส่วนบุณฑริกไม่มีรูปแบบไอโซไซม์ EST แบบที่ 4 (ตารางที่ 1)

รูปแบบที่ 5 มี 5 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.32, 0.4, 0.43, 0.45 และ 0.46 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) แหลมแก้วมีจำนวน 3 ต้น ลูกผสมมีจำนวน 3 ต้น ส่วนบุณฑริกไม่มีรูปแบบไอโซไซม์ EST แบบที่ 5 (ตารางที่ 1)

รูปแบบที่ 6 มี 4 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.18, 0.32, 0.4 และ 0.43 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) บุณฑริกมีจำนวน 3 ต้น แหลมแก้วมีจำนวน 2 ต้น ส่วนลูกผสมไม่มีรูปแบบไอโซไซม์ EST แบบที่ 6 (ตารางที่ 1)

รูปแบบที่ 7 มี 3 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.32, 0.4 และ 0.43 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) แหลมแก้วมีจำนวน 1 ต้น ลูกผสมมีจำนวน 2 ต้น ส่วนบุณฑริกไม่มีรูปแบบไอโซไซม์ EST แบบที่ 7 (ตารางที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ได้แสดงรูปแบบของไอโซไซม์ EST ต่างกันดังต่อไปนี้

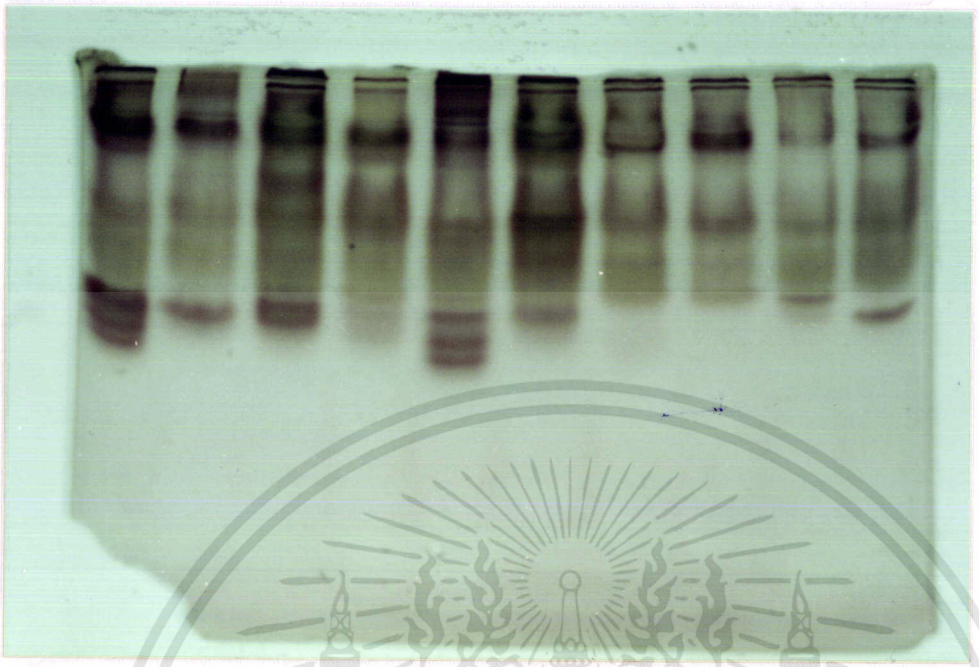
Group of Pattern	บุณฑริก (จำนวนต้น)	แหลมแก้ว (จำนวนต้น)	ลูกผสม (จำนวนต้น)
1	15	3	2
2	-	7	7
3	2	3	2
4	-	1	4
5	-	3	3
6	3	2	-
7	-	1	2

ตารางที่ 1 แสดงกลุ่มรูปแบบของไอโซไซม์ EST ในบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์ พันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง

จากการทดลองในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม ได้แสดงรูปแบบไอโซไซม์ PEX ดังภาพที่ 6

ภาพที่ 6a ตัวอย่างที่ 1-4 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ตัวอย่างที่ 5-8 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว
ตัวอย่างที่ 9-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

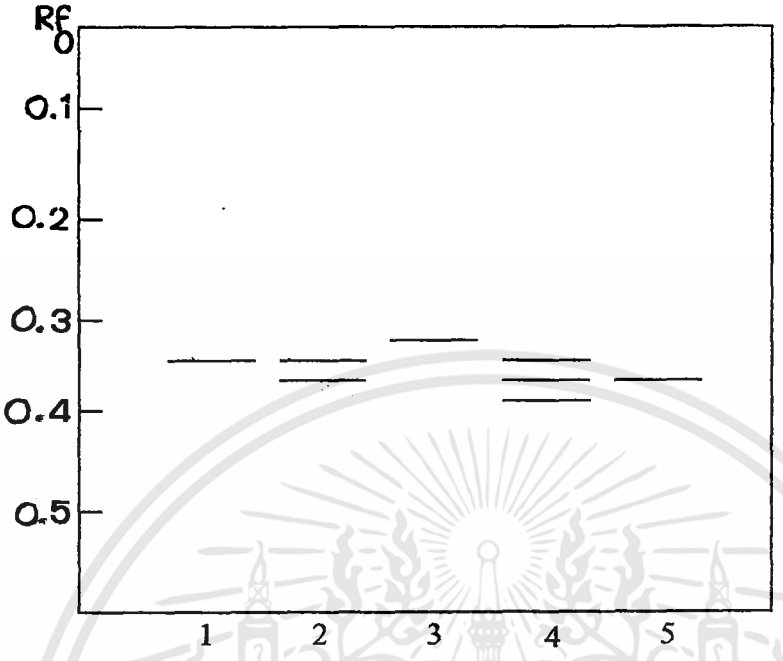


ภาพที่ 6b ตัวอย่างที่ 1-3 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ตัวอย่างที่ 4-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว
ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม

ภาพที่ 6c ตัวอย่างที่ 1-3 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ตัวอย่างที่ 4-6 บัวหลวงพันธุ์แหลมแก้ว
ตัวอย่างที่ 7-10 บัวหลวงพันธุ์ลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบไอโซไซม์ PEX ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พันธุ์แหลมแก้ว และพันธุ์กลาย มีรูปแบบที่ปรากฏทั้งหมด 5 รูปแบบ นำมาเขียน zymogram ได้ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 รูปแบบของไอโซไซม์ PEX 5 แบบในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหลมแก้ว และลูกผสม

รูปแบบที่ 1 มี 1 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.35 (ภาพที่ 7) จากตัวอย่างบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์ พันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง บุณฑริกมีจำนวน 12 ต้น แหลมแก้วมีจำนวน 7 ต้น และลูกผสมมีจำนวน 5 ต้นที่มีรูปแบบไอโซไซม์ PEX แบบที่ 1 (ตารางที่ 2)

รูปแบบที่ 2 มี 2 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.35 และ 0.37 ตามลำดับ (ภาพที่ 7) บุณฑริกมีจำนวน 3 ต้น แหลมแก้วมีจำนวน 3 ต้น และลูกผสมมีจำนวน 6 ต้นที่มีรูปแบบไอโซไซม์ PEX แบบที่ 2 (ตารางที่ 2)

รูปแบบที่ 3 มี 1 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.32 (ภาพที่ 7) แหลมแก้วมีจำนวน 2 ต้น ลูกผสมมีจำนวน 1 ต้น ส่วนบุณฑริกไม่มีรูปแบบไอโซไซม์แบบที่ 3 (ตารางที่ 2)

รูปแบบที่ 4 มี 3 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.35, 0.37 และ 0.39 ตามลำดับ (ภาพที่ 7) บุณฑริกมีจำนวน 3 ต้น แหลมแก้วมีจำนวน 4 ต้น และลูกผสมมีจำนวน 5 ต้นที่มีรูปแบบไอโซไซม์แบบที่ 4 (ตารางที่ 2)

รูปแบบที่ 5 มี 1 แถบ วัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.37 (ภาพที่ 7) บุณฑริกมีจำนวน 2 ต้น แหลมแก้วมีจำนวน 2 ต้น และลูกผสมมีจำนวน 2 ต้นที่มีรูปแบบไอโซไซม์แบบที่ 5 (ตารางที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปแบบของไอโซไซม์ PEX ของตัวอย่างบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์ได้แสดงรูปแบบของไอโซไซม์ ที่ต่างกันดังต่อไปนี้

Group of Pattern	บุณฑริก (จำนวนต้น)	แหลมแก้ว (จำนวนต้น)	ลูกผสม (จำนวนต้น)
1	12	7	5
2	3	3	6
3	-	2	1
4	3	4	5
5	2	2	2

ตารางที่ 2 แสดงกลุ่มรูปแบบของไอโซไซม์ PEX ในบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปแ ละวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อศึกษาถึงความแตกต่างของแบบแผนไอโซไซม์ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พันธุ์แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม โดยการใช้เอนไซม์ EST และ PEX ในเอนไซม์ EST ปรากฏรูปแบบไอโซไซม์ที่ต่างกัน 7 รูปแบบ และในเอนไซม์ PEX ปรากฏเอนไซม์ที่ต่างกัน 5 รูปแบบ ซึ่งจากการทดลองโดยการใช้ความแตกต่างของแบบแผนไอโซไซม์เป็นตัวจำแนกยังไม่สามารถระบุถึงความแตกต่างได้อย่างชัดเจนในแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากในบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์ซึ่งใช้ในการทดลองนั้น มีการกระจายของรูปแบบไอโซไซม์ที่มีบางรูปแบบที่เหมือนกัน

ในการศึกษาโดยการใช้ลักษณะภายนอกหรือลักษณะทางสันฐานวิทยาพบว่าบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก โดยบัวหลวงพันธุ์แหลมแก้วมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แต่จะมีสีเขียวมากกว่าบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก บัวหลวงแหลมแก้วอาจจะเป็น variation ที่กลายมาจากบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ซึ่งเกษตรกรเข้าใจว่าเป็นบัวหลวงอีกพันธุ์หนึ่ง ซึ่งแท้จริงแล้วเป็นบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกชนิดหนึ่ง เนื่องจากรูปแบบไอโซไซม์ของบัวหลวงแหลมแก้วมีรูปแบบไอโซไซม์ที่เหมือนกับบัวหลวงบุณฑริกในบางรูปแบบ ส่วนพันธุ์ลูกผสมอาจจะเกิดจากการผสมกันระหว่างพันธุ์บุณฑริกและสัตตบุษย์ เนื่องจากมีลักษณะทางสันฐานวิทยาที่เป็นกึ่งกลางระหว่างบัวหลวงทั้งสองพันธุ์ จากการทดลองพบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้มีบางรูปแบบที่เหมือนกับบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

จากการจำแนกโดยการใช้เอนไซม์ EST และ PEX พบว่าบัวหลวงพันธุ์แหลมแก้วและพันธุ์ลูกผสมมีรูปแบบไอโซไซม์ที่เหมือนกัน น่าจะยืนยันได้ว่า บัวหลวงทั้ง 2 ชนิดมีส่วนเกี่ยวข้องกันกับบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในงานด้านอนุกรมวิธาน การปรับปรุงพันธุ์พืช และการจำแนกพันธุ์พืชต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กสิน สุวตะพันธุ์.2500.บัวนานาพันธุ์, **พฤกษชาติ (1).**โรงพิมพ์รุ่งเรือง, กรุงเทพฯ. หน้า 40-47.

คณิตา เลขะกุล.2536.**บัว ราชินีแห่งไม้น้ำ:มูลนิธิสวนหลวง ร.9.**ด่านสุทธาการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.123 หน้า.

จารีย์ หอยทอง.2519.**การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบางชนิดในประเทศไทย.**วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล.2538.**เทคนิคการตรวจสอบและจำแนกพันธุ์โดยใช้ Isozyme pattern.**เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ การตรวจแยกสายพันธุ์พืชโดยการใช้ Isozyme pattern และ RADP ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ,นครปฐม.หน้า 16-36.

ชุติมา คงจรูญ.2538.**การศึกษาไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดรสของใบลำใยพันธุ์สีชมพู.**การประชุมวิชาการครั้งที่ 1 ของสถาบันการเกษตรแม่โจ้ ณ สถาบันการเกษตรแม่โจ้,เชียงใหม่.หน้า 160-165.

ณพพร ดำรงศิริ.2530.**พฤกษอนุกรมวิธาน.**ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

เทพบุตร ดีรักษาพร, ประพิณศรา สอนเล็ก และแสงชัย ศรีประโคน.2540.**การศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็นพ่อแม่ลูกระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว.**โครงงานพิเศษ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

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

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์, ศิริวรรณ บรีคำ, สุพัฒน์ อรรถธรรม และสังกาส พิรพยะสุรวงศ์.2531. การแยกสายพันธุ์และเพศของเนื้อเยื่อมะละกอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.**ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช.**เล่มที่ 8 ตุลาคม-ธันวาคม:หน้า16.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์, สมนึก พรมแดง และสมบูรณ์ บุญปรีชา. 2529. **การแยกสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจด้วยรูปแบบของไอโซไซม์.**รายงานการวิจัย หน่วยชีวเคมีและห้องปฏิบัติกลาง ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน, นครปฐม. 40 หน้า.

วาสนา มิตระนนท์.2527.**การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวสกุลบัวหลวง (*Nelumbo* Adans) ในประเทศไทย.**วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย.2518.**งานนิทรรศการสมุนไพร**.มงคลการพิมพ์,กรุงเทพฯ.150 หน้า.

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

สุปราณี วนิชชานนท์.2540.**คู่มือการปลูกไม้ตัดดอก**.สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร,กรุงเทพฯ.81หน้า.

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

เสริมลาภ วสุวัต.2526.**อุบลชาติ สารานุกรมไม้ประดับในประเทศไทย เล่ม 3**.อมรินทร์การพิมพ์, กรุงเทพฯ, 276-318.

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

อรวรรณ ช้างพันธ์.2542.**การศึกษาแบบไอโซไซม์ในบัวประดับ**.ปัญหาพิเศษปริญญาตรี.ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,กรุงเทพฯ.44 หน้า.

อาภัสสรา ชมิตท์.2537.**เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซีส**.สำนักพิมพ์รั้วเขียว,กรุงเทพฯ.85หน้า.

อุทัย สินธุสาร.2525.**สารานุกรมไม้ประดับในประเทศไทย เล่ม3**.อมรินทร์การพิมพ์,กรุงเทพฯ.463 หน้า.

Backer,C.A. and R.C. Bakhuizen.1963. **Folra of Java**. Netherland. (Gruningen) :N.V.P. NoordhoFF. 63 P.

Core,L.E.1955. **Plant Taxonomy** .Englewood Cliffs. Prentice-Hall,Lnc. New Jersey. 459 P.

Correll, D.S. and H.B. Correll.1975. **Aquatic and Wetland Plants of Southwestern United States**. Standford University Press, Standford. 1,777 P.

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

Harris , W.H. and J.S. Lerey.1975. **The new Columbia Enoyolopedia** 4th ed. NewYork: Columbia University Press. 3720 P.

Hutchison, J.1959. **The Family of Flowering Plants**. The clarendohn Press, Oxford. 510P.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lawrenve, H.M. 1967. Nympheaceae. **Taxonomy of Vascular Plants**. Oxford and Ibh. Publishing Conpany, Calcutta. 823 P.

Pasteur, N.,G. Pasteur, F. Bonhomme , J. Calalan and J. Britton-Daidian. 1988. **Practical Isozyme genetics**. EllisHorword.Ltd., London. 215P.

Suvatabandhu, k. 1958. **On The Nymphaeacea of Thailand**. Nat. Hist. Bull. Siam. Soc. 17: 11-15.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้