ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของบัวหลวงพันธุ์ปทุมและสัตตบงกช

Studies of Isozyme Patterns in Pathum and Satabankacha cultivar of *Nelumbo nucifera* Gaertn.

โดย

นางสาว กมลรัตน์ แสงสอาด

ได้รับความเห็นชอบจาก

.....

(อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ. สมภพ ฐิตะวสันต์)

วันที่ 30 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวหลวงพันธ์ปทุมและสัตตบงกช

Studies of Isozyme Pattern In Pathum and Satabankacha cultivar of *Nelumbo nucifera* Gaertn.

โดย

นางสาวกมลรัตน์ แสงสอาด

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สจ.
ว 1361
เลขหมู่ 2543
เลขทะเบียน 41711
วัน, เดือน, ปี 27 ก.พ. 2545

.b.....
.i.....

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	**การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของบัวหลวงพันธุ์ปทุม และสัตตบงกช**
	Studies of Isozyme Pattern In *Nelumbo nucifera* Gaertn.
โดย	นางสาวกมลรัตน์ แสงสอาด
ภาควิชา	พืชสวน **สาขาวิชา** พืชสวน
คณะ	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การศึกษาไอโซไซม์ในบัวหลวง 2 สายพันธุ์ คือ บัวหลวงพันธุ์ปทุมและ สัตตบงกช จากส่วนของใบอ่อนและก้านอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้สารสกัดที่ประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7, 1mM EDTA, 0.5% PVP, 2 mM DTT และ 10 mM mercaptoethanol โดยใช้เอนไซม์ 2 ระบบคือ EST และ PRX ในการศึกษาพบว่า EST ให้รูปแบบของไอโซไซม์ 15 รูปแบบ และ PRX ให้รูปแบบของไอโซไซม์ 11 รูปแบบ แต่ไอโซไซม์ทั้ง 2 ระบบไม่สามารถแยกพันธุ์บัวหลวงทั้งสองพันธุ์ออกจากกันได้ แต่พบว่าในแต่ละพันธุ์ก็มีความหลากหลายที่ทำให้มีรูปแบบของไอโซไซม์ที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Studies of Isozyme Pattern In Pathum and Satabankacha cultivar of *Nelumbo nucifera* Gaertn.
By	Miss Kamonrut Sangsa-ard
Department	Horticalture
Faculty	Agriculture Technology
Advisor	Miss Kanjana Saetiew

Abstract

Studies isozyme pattern in 2 cultivars of *Nelumbo nucifera* Gaertn were Pathum and Satabankacha ,used young leaf and young petiale from tissue culture. The consist of extraction buffer was 0.1 Tris-HCl pH7, 1mM EDTA, 0.5% PVP, 2mM DTT and 10mM mercaptoethanol. Two enzyme systems were used to study, esterase (EST) and peroxidase (PRX). EST showed isozyme pattern 15 groups and PRX 11 groups. Two enzyme systems could not be resolved 2 cultivars,but each cultivars had variation that appeared different isozyme pattern.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์กัญจนา แซ่เตียว ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆตลอดระยะเวลาในการทำปัญหาพิเศษ นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือจากเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาพืชสวน รวมทั้งความช่วยเหลือจากเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนในการทำการทดลอง ซึ่งทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จเรียบร้อยอย่างสมบูรณ์ได้ จึงขอขอบพระคุณทุกท่านที่กล่าวมา และยังมีอีกหลายท่านที่ไม่อาจกล่าวได้หมด ณ ที่นี้

ปัญหาพิเศษเล่มนี้ขอมอบให้กับ บิดา มารดา ซึ่งได้ให้การสนับสนุน ให้กำลังใจและทุนทรัพย์ในการทำ รวมทั้งครูอาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาต่างๆ และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ทำให้สำเร็จลุล่วงไปได้ หากเกิดข้อผิดพลาดประการใดข้าพเจ้าต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กมลรัตน์ แสงสอาด

เมษายน 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และสารเคมี	12
วิธีดำเนินการ	14
วันและสถานที่ทำการทดลอง	17
ผลการทดลอง	18
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 บัวหลวงพันธุ์ปทุม	13
ภาพที่ 2 บัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช	13
ภาพที่ 3 zymogram ของการตรวจจับ activity ของ EST	18
ภาพที่ 4 zymogram ของการตรวจจับ activity ของ PRX	20
ภาพที่ 5 การแสดงออกของเอนไซม์ EST พันธุ์ปทุม คอลัมน์ที่ 1-4, 6 พันธุ์สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 5, 7-10	25
ภาพที่ 6 การแสดงออกของเอนไซม์ EST พันธุ์ปทุม คอลัมน์ที่ 1-5 พันธุ์สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 6-10	26
ภาพที่ 7 การแสดงออกของเอนไซม์ EST พันธุ์ปทุม คอลัมน์ที่1-5 พันธุ์สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 6-10	27
ภาพที่ 8 การแสดงออกของเอนไซม์ EST พันธุ์ปทุม คอลัมน์ที่ 1-5 พันธุ์สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 6-10	28
ภาพที่ 9 การแสดงออกของเอนไซม์ PRX พันธุ์ปทุม คอลัมน์ที่ 1-4,6 พันธุ์สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 5, 7-10	29
ภาพที่ 10 การแสดงออกของเอนไซม์ PRX พันธุ์ปทุม คอลัมน์ที่ 1-5 พันธุ์สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 6-10	30
ภาพที่ 11 การแสดงออกของเอนไซม์ PRX พันธุ์ปทุม คอลัมน์ที่ 1-5 พันธุ์สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 6-10	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	รูปแบบของไอโซไซม์ EST ที่พบในบัวหลวง พันธุ์ปทุมและสัตตบงกช	19
ตารางที่ 2	รูปแบบของไอโซไซม์ PRX ที่พบในบัวหลวง พันธุ์ปทุมและสัตตบงกช	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

" บัว " เป็นพืชที่มีบทบาทในโลกมาแต่โบราณแล้ว จากหลักฐานทางประวัติศาสตร์มีการค้นพบดอกบัวแห้งในสุสานกษัตริย์รามาเรส และตุตันคาเมนแห่งอียิปต์ ซึ่งมีอายุ 3000 - 4000 ปีมาแล้ว เรียกกันว่า " บัวหลวงอียิปต์ " เมื่อนำมาจำแนกโดยนักอนุกรมวิธาน พบว่าเป็นอุบลชาติจำพวกบัวสาย ส่วนในบริเวณลุ่มแม่น้ำสินธุประเทศอินเดีย ได้มีการขุดค้นซากโบราณสถานโบราณวัตถุ พบว่ามีลวดลายรูปทรงดอกบัวและกลีบบัวหลวงมากมาย นอกจากยังมีการค้นพบเมล็ดบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ณ. เมืองถ่านหินแห่งหนึ่งในแมนจูเรียและจีน มีอายุระหว่าง 3000 - 4000 ปี เมื่อนำมาทดลองเพาะใช้เวลาถึง 18 เดือน จึงงอกให้ดอกสีชมพูมีกลีบ 5 - 7 กลีบ กลีบยาวแคบ มีเมล็ดน้อยรีเล็กกว่าบัวในปัจจุบัน (เสริมลาภ. 2537)

ปัจจุบันบัวหลวงเป็นไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญ ทั้งใช้ภายในประเทศสำหรับเป็นเครื่องสักการะพระพุทธรูป จัดดอกไม้และยังเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ ทั้งดอกบัวเพื่อทำดอกไม้แห้งและใบบัวก็ยังใช้ประดับตกแต่งอาหารอีกด้วย จึงเป็นพืชที่มีความต้องการในการใช้สูงโดยเฉพาะตลาดภูมิภาค เมื่อตลาดมีความต้องการบัวหลวงสูงเกษตรกรจึงหันมาประกอบอาชีพปลูกบัวทำเป็น " นาบัว " ซึ่งเป็นอาชีพหนึ่งที่ให้ผลตอบแทนแก่เจ้าของอย่างคุ้มค่า (พานิชย์.2540)

การวิเคราะห์สายพันธุ์พืชโดยใช้วิธีการทางชีวเคมีมาประยุกต์ได้รับการยอมรับมาเป็นเวลานานแล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ไอโซไซม์ ซึ่งเป็นผลผลิตจากการทำงานของยีนที่ควบคุมการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมมาช่วยในการจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ของเอนไซม์ที่คงตัวในแต่ละพันธุ์ ซึ่งไอโซไซม์นี้สามารถแยกได้โดยการทำไอโซไซม์อิเลคโทรโฟรีซิส ได้รูปแบบของแถบไอโซไซม์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายหรือตัวบ่งบอกความเฉพาะเจาะจงของพันธุ์พืชได้ (สุชาติ. 2539)

ในการทดลองครั้งนี้ ได้สุ่มบัวหลวงพันธุ์ละ 20 กอพันธุ์ (clone) โดยใช้เอนไซม์ 2 ระบบ คือ เอสเทอเรส และเปอร์ออกซิเดส เพื่อศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ของบัวหลวงพันธุ์ปทุมและพันธุ์สัตตบงกช และศึกษาถึงความหลากหลาย (variation) ภายในบัวหลวงกลุ่มเดียวกัน

กมลรัตน์ แสงสอาด

เมษายน 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ของบัวหลวงพันธุ์ปทุม และพันธุ์สัตตบงกช
- เพื่อศึกษาความหลากหลายของบัวหลวงภายในกลุ่มเดียวกัน (พันธุ์เดียวกัน) ทั้งสองพันธุ์
- เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์กับงานทางด้านการจำแนกพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

บัวจัดอยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae แบ่งเป็น 3 สกุล

-สกุล Nelumbo มีใบชูเหนือน้ำ ได้แก่ บัวหลวง หรือปทุมชาติ (Lotus)

- สกุล Nymphaea ใบลอยแตะผิวน้ำ ไม่มีหนาม เป็นพวกอุบลชาติ (water lily) ได้แก่ บัวผัน บัวเผื่อน บัวฝรั่ง บัวสาย

-สกุล Victoria ลอยแตะผิวน้ำ มีขนาดใหญ่ ขอบใบตั้งเป็นขอบคล้ายกระด้ง และมีหนาม ได้แก่ บัวกระด้ง บัวหลวง (Lotus) มี 2 สี คือ

1. บัวหลวงสีขาว

1.1 บุณฑริก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Nelumbo nucifera*

ชื่อสามัญ : Hindu lotus

ลักษณะ : ดอกขนาดใหญ่ ปลายเรียว ดอกรา (ดอกฉลวย) ไม่มีกลีบซ้อน

ชื่ออื่นๆ : ปุณฑริก, บัวหลวงทอง, บัวแหลมขาว

1.2 สัตตบุษย์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Nelumbo nucifera*

ชื่อสามัญ : Magnolia lotus, album plenum (ภาษาละติน)

ลักษณะ : ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมทรงป้อม กลีบดอกซ้อนมาก

ชื่ออื่นๆ : บัวฉัตรขาว, บัวป้อมทอง, บัวหลวงขาวซ้อน

2.บัวหลวงสีชมพู

2.1 ปทุม

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Nelumbo nucifera*

ชื่อสามัญ : East India Lotus

ลักษณะ : ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลายเรียว ดอกรา

ชื่ออื่นๆ : ปัทมา, โกกระณต, บัวหลวงชมพู, บัวหลวงแดง, บัวแหลมแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สัตตบงกช

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Nelumbo nucifera*

ชื่อสามัญ : Roseum plenum (ภาษาละติน)

ลักษณะ : ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมทรงป้อม กลีบดอกซ้อนมาก

ชื่ออื่นๆ : บัวหลวงป้อมแดง, บัวฉัตรแดง (เสริมลาภ. 2537)

นอกจากนี้ยังพบบัวหลวงที่มีขนาดเล็กทั้งสองสี บัวหลวงพันธุ์ดอกสีชมพูเล็กมีชื่อว่าบัวหลวงจีน บัวปักกิ่งสีชมพู หรือบัวเข็มสีชมพู สีและรูปทรงของดอกคล้ายบัวหลวงพันธุ์ปทุมเพียงแต่ขนาดของดอกเล็กกว่า บัวหลวงพันธุ์สีขาวดอกเล็กมีชื่อว่า บัวหลวงจีน บัวปักกิ่งสีขาว บัวเข็มสีขาว สีและรูปทรงของดอกคล้ายบัวพันธุ์บุณฑริกแต่มีขนาดของดอกเล็กกว่า (พาณิชย์. 2540)

บัวหลวงมีถิ่นกำเนิดในถิ่นทวีปเอเชีย เช่น จีน อินเดีย ไทย สภาวะที่เหมาะสมคือ ดินเหนียว หรือ เพียงแค่ระดับน้ำ 15 ซม. หรือมีดินแฉะๆ ก็สามารถเจริญได้ สามารถปลูกในบ่อ หรือสระ หรือภาชนะจำกัดได้ แต่ต้องย้ายปลูกบ่อยๆ เพราะเมื่อเหง้าเจริญจนแน่นภาชนะจะทำให้ดอกและใบมีขนาดเล็ก และน้อยลง บัวหลวงต้องการแสงแดดกึ่งร่ม กึ่งแดด ถึงแดดเต็มที่ ไม่พักตัวในฤดูหนาว ขยายพันธุ์โดยติดเมล็ดได้ง่าย ยกเว้นบัวสัตตบงกช เพราะดอกไม่ค่อยบาน จึงขยายพันธุ์โดยการแยกไหล (เสริมลาภ. 2537)

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ทำการจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับชนิด(specie) โดยใช้เทคนิคต่างๆ ทั้งทางเคมี และชีวเคมี เพื่อที่จะจำแนกและบ่งลักษณะของสายพันธุ์พืช พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พืชแสงออกให้เห็นในธรรมชาติที่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์นั้นย่อมจะมีความแตกต่างกันในทางชีวเคมี แต่ความแตกต่างกันทางชีวเคมีไม่จำเป็นเสมอไป ที่พืชจะมีลักษณะแตกต่างกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยา แสดงว่าความแตกต่างทางชีวเคมีมีมากกว่าความแตกต่างกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยา จึงน่าจะใช้ความแตกต่างทางชีวเคมีในการประเมินความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ การศึกษาโมเลกุลของโปรตีน หรือเอนไซม์ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่แสดงความสัมพันธ์ ระหว่างต้นพืชได้ว่าเหมือนหรือต่างกัน เนื่องจากข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic) ที่ถ่ายทอดจาดพ่อแม่มาสู่ลูก จะถูกแปลงเป็นโมเลกุลโปรตีน หรือเอนไซม์โดยตรงก่อนที่จะสร้างโมเลกุลอื่น เพราะฉะนั้นลักษณะทางพันธุกรรมของพืชย่อมอาศัยเอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ได้ในการศึกษาด้านการจำแนกพันธุ์ (systematics)หรือด้านวิวัฒนาการทางพันธุกรรม(phylogenetic) โดยการพิจารณาลักษณะทางภายนอกอย่างเดียวนับว่าเป็นเรื่องค่อนข้างยุ่งยาก เช่น พืชบางชนิดมีการออกดอกปีละครั้ง ดังนั้นการศึกษาไอโซไซม์ (isozyme) ในพืชร่วมกับการพิจารณาลักษณะภายนอกของพืชจะมีประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น (นิยะดา. 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซไซม์ (isozyme) คือ เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์หนึ่ง ซึ่งกระตุ้น หรือทำปฏิกิริยาเดียวกัน แต่มีรูปร่างหรือมวลต่างกัน ต่อมา International Union of Biochemistry (IUB) ปี ค.ศ. 1979 ได้ตีพิมพ์ความหมายของไอโซไซม์ตามที่ Markert ที่ให้ไว้ในปีค.ศ. 1977 ว่า คือ เอนไซม์ที่มีรูปแบบต่างๆ กัน เป็นเอนไซม์สากล (พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไป)

- เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาเดียวกัน
- อยู่ใน metabolic pathway เดียวกัน
- มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์
- ความแตกต่างของโมเลกุลของไอโซไซม์ มีความสัมพันธ์กับความยืดหยุ่น (ขอบเขต)
- ประสิทธิภาพ และความเที่ยงตรงของเซลล์ (สมศักดิ์. 2541)

การศึกษาไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซีส นับว่าเป็นวิธีการที่กระทำได้อย่างรวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองเวลาในการศึกษา และสามารถตรวจสอบผลซ้ำได้ (นิยะดา. 2539) การที่การวิเคราะห์สายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ประสบความสำเร็จสูงขึ้น เนื่องจากพืชชนิดหนึ่งนั้นจะแสดงไอโซไซม์หลายๆ รูปแบบ แต่ในสายพันธุ์เดียวกันจะแสดงลักษณะไอโซไซม์เฉพาะตัว (ชุติมา. 2538) มีพืชหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จมาก การศึกษาไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์ เช่น หญ้าอัลฟัลฟา สตรอเบอรี่ อ้อย แอปเปิล กล้วย สับปะรด ท้อ มะม่วง และมันเทศ เป็นต้น (นิยะดา. 2539) เอนไซม์ต่างๆ สามารถสกัดได้จากส่วนต่างๆ ของพืช โดยอาศัยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซีส ซึ่งสามารถศึกษาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกอพันธุ์ (clone) ของพืชชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกัน หรือจำแนกพันธุ์พืชได้จากแบบของไอโซไซม์ (isozyme pattern) ทั้งนี้เอนไซม์หลายชนิดที่สร้างขึ้น แล้วอาจเกิดขบวนการทางเคมีบางอย่าง เช่น methylation หรือ phosphorylation ทำให้เอนไซม์ถูกเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะ side chain ของกรดอะมิโนในโมเลกุลของเอนไซม์ระหว่างการเจริญเติบโตหรือขบวนการต่างๆทางชีวเคมีได้ (อรวรรณ. 2543) สำหรับการตรวจสอบไอโซไซม์ที่ถูกแยกด้วยไฟฟ้าแล้ว สามารถนำ substate มาทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ ทำให้เกิดเป็นแถบของไอโซไซม์ซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษาได้ สาเหตุของความหลากหลายรูปแบบของไอโซไซม์อาจเกิดจากยีนต้นแบบมากกว่าหนึ่งยีน ซึ่งมีผลทำให้ลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างกันกลายมาเป็นโปรตีนต่างชนิดกัน หรืออาจเกิดจากการถอดและแปลรหัสจากยีนเดียวกัน แต่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายหลังการแปลรหัส (post-translational modification) (David.1983, สุชาติ. 2539)ทำให้เกิดโปรตีนต่างกัน และการตัดหรือเติมโมเลกุลเล็กๆจัดเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดไอโซไซม์ (สุชาติ. 2539)

Electrophoresis เป็นคำที่ใช้อธิบายการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า พอลิเมอร์ทางชีวภาพ (biological polymer) ส่วนใหญ่มีประจุจึงสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาศัยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซีสจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของ macromolecule ตัวอย่างเช่น มวลโมเลกุลของโปรตีน ความแตกต่างของโมเลกุลในแง่ประจุสุทธิ และรูปร่างของมัน รวมทั้งการแยกโมเลกุลที่แตกต่างกันด้วย

อิเลคโทรโฟรีซีสแบบโซน (Zone Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่สารละลายตัวอย่าง (sample solution) ถูกหยดเป็นจุด (spot) หรือถูกเคลือบเป็นแถบบางๆ บนตัวกลางค้ำจุนที่เฉื่อยต่อสารเคมี ตรงบริเวณที่ห่างจากอิเลคโทรด (electrode) พอควร แล้วปล่อยให้อนุภาคเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายไปบนตัวกลางที่อยู่ในสนามไฟฟ้า ตัวกลางอาจเป็นกระดาษกรอง เซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate) หรือเจล (gel) อิเลคโทรโฟรีซิส แบบโซนนี้มีประโยชน์ในการวิเคราะห์สารผสมหาความบริสุทธิ์ของสารและเตรียมสารให้บริสุทธิ์ เนื่องจากโมเลกุลถูกเคลือบเป็นแถบบางบนตัวกลางจึงใช้ปริมาณของสารตัวอย่างน้อย สำหรับตัวกลางค้ำจุนเจลมีหลายชนิด เช่น แป้ง (starch) พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) อะกาโรส (agarose) และอะกาโรส – อะคริอลาไมด์ (agarose – acrylamide) เจลพวกนี้ถูกเคลือบเป็นแผ่นบางๆ บนแผ่นพลาสติกหรือแผ่นกระจก การใช้ตัวกลางค้ำจุนเป็นเจลเหล่านี้จะให้ผลการแยกสารดีขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้แยกโปรตีนและกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ทั้งนี้เนื่องจากตาข่ายร่างแหของเจลจะลดการแพร่ และการแยกเป็นผลมาจากคุณสมบัติในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุล (molecular sieving)

อิเลคโทรโฟรีซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis ; PAGE) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีน และสารละลายโปรตีนผสม ถึงแม้ว่าเทคนิคการแยกแบบ 2 มิติจะมีประสิทธภาพสูงที่สุดในการแยกโปรตีนแต่อิเล็คโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล 1 มิติ ยังคงเป็นที่นิยมใช้ และให้ผลที่ดี PAGE เป็นเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซีสที่มีตัวกลางค้ำจุนเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งเฉื่อยต่อสารเคมีในระหว่างเกิดกระบวนการแยก สามารถลดการแพร่และการป้องกันการเกิดการพาทำให้การแยกได้แถบที่คมชัด รวมทั้งเป็นตัวกลางที่มีรูพรุนซึ่งทำหน้าที่เป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลได้ ขนาดรูพรุนของเจลที่เหมาะสมจะมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดใหญ่ช้าลงกว่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดเล็กกว่าทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกจากกันได้ ข้อดีของการใช้ตัวกลางพอลิอะคริลาไมด์เจล เพราะเป็นโพลิเมอร์ (synthetic polymer) ของอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ (acrylamide monomer) ซึ่งเตรียมจากสารที่มีความบริสุทธิ์สูง และยังเป็นสารที่เฉื่อยต่อสารเคมีเสถียร (stable) ที่ช่วง pH อุณหภูมิกว้าง และยังโปร่งใส สามารถเตรียมเจลที่มีขนาดรูพรุนได้ขนาดต่างๆกัน ซึ่งต่างจากแป้งที่มีรูพรุนค่อนข้างจำกัด และอาจมีสารปนเปื้อน เพราะเตรียมจากผลผลิตทางชีวภาพทำให้มีผลต่อการแยกสารได้ ไอออนที่มีประจุหรือหมู่ที่มีประจุเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ได้ โปรตีนก็เช่นเดียวกัน เป็นแมคโครโมเลกุลที่มีประจุที่ pH ต่างๆ เพราะฉะนั้นจึงเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้า และอัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความหนาแน่นของประจุ (change density) ของโปรตีน ความหนาแน่นของประจุ หมายถึง อัตราส่วนของประจุต่อมวล (change/mass) ถ้าอัตราส่วนนี้สูงโมเลกุลจะเคลื่อนที่ได้เร็ว เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับสารละลายโปรตีนผสม โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกันทำให้แยกออกจากกันได้ (อาภัสสรา. 2537)

Disc eletrophoresis ถือว่าเป็นเทคนิค Zone eletrophoresis ที่ใช้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์และจำแนกชนิดของโปรตีนที่ปะปนกันอยู่ได้อย่างละเอียด ทำให้ผลของแถบสีคมชัดที่สุด คำว่า disc หมายถึง ระบบอิเลคโทรโฟรีซิสที่ใช้สารบัฟเฟอร์ที่มี pH discontinuity และ voltage discontinuity หลักการของระบบนี้เป็นการเตรียมเจลในรูปของคอลัมน์แนวดิ่ง (vertical column) หรือเป็นแผ่น (slab) โดยจะแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ชั้นตัวอย่าง (sample gel) จะอยู่บนสุด รองลงมาคือ stacking gel หรือ spacer gel ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเจลต่ำ (3 – 5 %) ส่วนชั้นล่างสุดเรียกว่า separating gel หรือ running gel ซึ่งมีความเข้มข้นของเจลสูงขึ้น (7.5 – 12.5 %) ชั้นบนและชั้นล่างจะมีขนาดช่องของเนื้อเจล (pore size) ใหญ่กว่าชั้นล่างสุดเนื่องจากการผสมของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำกว่า ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างที่หยอดในช่องเจลเคลื่อนที่ได้เร็ว สนามไฟฟ้าที่มีแรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงสามารถผลักตัวเองให้เคลื่อนที่ได้เร็วในบริเวณ stacking gel ตัวอย่างสามารถรวมอยู่ระหว่างรอยต่อของ stacking gel และ separating gel ได้มาก การเคลื่อนที่โมเลกุลในส่วนของ separating gel จะช้าลง เนื่องจากขนาดช่องของเนื้อเจลมีขนาดเล็กลง ทำให้สามารถแยกความบริสุทธิ์ของโปรตีนและเอนไซม์เป็นแถบๆ เมื่อทำปฏิกิริยาสีย้อมจึงเห็นเป็นแถบสีที่คมชัด (อรวรรณ. 2543)

การวิเคราะห์สายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ได้ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด กัญจนา และพิมพ์ใจ (2540) ศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ในเนื้อเยื่อต่างๆของต้นปทุมมา การวิเคราะห์รูปแบบของไอโซไซม์จากเนื้อเยื่อชิ้นส่วนต่างๆได้แก่ หัว ราก ยอด และดอกของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) กลีบกว้างพันธุ์คัดเลือก (Siam Tulip หรือ Chiang Mai Pink) และปทุมมากลุ่มกลีบแคบ แบบแผนของไอโซไซม์ 7 ชนิด ได้แก่ esterase (EST), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), leucine amino peptidase (LAP), shikimate dehydrogenase (SKD), malic enzyme (ME), malate dehydrogenase(MDH), และ glutamate dehydrogenase (GLD) ศึกษาโดยการใช้ polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเนื้อเยื่อที่ทดสอบทุกส่วนสามารถใช้หารูปแบบของไอโซไซม์ได้ แต่เนื้อเยื่อส่วนยอดให้รูปแบบของไอโซไซม์ที่เตรียมจากแต่ละสายต้นของทั้งปทุมมากลีบกว้าง และปทุมมากลีบแคบ พบว่าไอโซไซม์ชนิดเดียวกันในปทุมมากลีบกว้างจะมีรูปแบบของไอโซไซม์ที่เหมือนกัน แต่ต่างกันในปทุมมากลีบแคบ (ยกเว้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GLD และ ME) สรุปได้ว่าปุทมมากลีบกว้างพันธุ์คัดเลือกทั้งหมดที่นำมาทดสอบน่าจะมาจากสายต้นเดียวกัน และน่าจะมาจากคนละสายต้นในปทุมมากลีบแคบ

ศิวพรและสุจิตรา (2540) ศึกษาไอโซไซม์ในใบมะม่วงโคลนต่างๆจาก 4 พันธุ์ คือ น้ำดอกไม้ เขียวเสวย แรด และหนังกลางวัน โดยวิธี Starch gel electrophoresis จากการวิเคราะห์ไอโซไซม์ 11 ระบบ ผลปรากฏว่าสามารถตรวจจับ activity ของเอนไซม์ได้ 8 ระบบ ได้แก่ SKDH, IDH 6 – PGDH, G – 6 – PDH, Diaphorase, PGM, MDH และ GOT แต่พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ SKDH และ IDH ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างโคลนจากทุกพันธุ์ที่ทำการทดสอบ ส่วนอีก 3 ระบบที่ไม่สามารถตรวจพบ activity ของเอนไซม์คือ FDH,LAP และ GDH

ศุจิรัตน์และคณะ (2538)นำใบอ่อนและใบแก่พืชสกุลระกำที่ทราบเพศแล้วมาศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์ไอโซไซม์เพื่อใช้ตรวจแยกความแตกต่างของไอโซไซม์ชนิดต่างๆโดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ผลปรากฏว่าสารสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับพืชสกุลนี้ คือ บัฟเฟอร์ชนิดที่ 5 ซึ่งประกอบด้วย 0.5 M Tris – HCl pH 7.5, 100 mM EDTA, 1M $MgCl_2$, 1M KCl, 10% PVP และ 0.1% 2 – mercaptoethanol และความเข้มข้นของเจลที่ให้ผลชัดเจนคือ 7% สำหรับการวิเคราะห์ไอโซไซม์ทั้งหมด 13 ระบบ พบว่าสามารถตรวจจับ activity ของเอนไซม์ได้เพียง 4 ระบบ คือ Peroxidase, Esterase, MDH และ AAT แต่ไม่มีระบบใดเลยที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย อย่างไรก็ตามพบว่าการเรียงตัวของ Peroxidase isozyme ของกลุ่มสละแตกต่างจากระกำ

เพื่อนแก้ว (2529) ศึกษาลักษณะเอสเทอเรสไอโซไซม์ในมะละกอ โดยใช้วิธี Horizontal Agar Gel Thin Layer ด้วยเครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส กับมะละกอสายพันธุ์การค้าไทย 3 พันธุ์ คือ โกโก้ แขกดำ และวัดเพลง เปรียบเทียบกับพันธุ์การค้าต่างประเทศ 2 พันธุ์คือ Sunrise Solo และ Kapoho Solo พบว่าสามารถใช้เอสเทอเรสไอโซไซม์เป็นแนวทางในการแยกกลุ่มพันธุ์การค้าไทยกับกลุ่มพันธุ์การค้าต่างประเทศได้ โดยการดูระยะการเคลื่อนที่ของแถบเอสเทอเรสไอโซไซม์ที่ 3 ซึ่งแตกต่างกัน และลักษณะของเอสเทอเรสในแต่ละกลุ่มก็มีความคล้ายคลึงกันมาก สำหรับการศึกษาเอสเทอเรสไอโซไซม์ เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างต้นตัวผู้ ต้นตัวเมีย และต้นสมบูรณ์เพศในมะละกอพันธุ์พื้นเมืองจาก อำเภอ ฝาง จังหวัด เชียงใหม่ พบว่า มีจำนวนแถบเอสเทอเรสไอโซ-ไซม์ 6 แถบเท่ากัน และลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบเอสเทอเรสไอโซไซม์คล้ายคลึงกันมาก จึงไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน

ชุติมา (2538) ศึกษาไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบลำไยพันธุ์สีชมพู โดยวิธี non – denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และ semi sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าในสารสกัดที่ได้จากใบลำไยในช่วงระยะการติดผล ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 1 –

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

60 วัน ภายหลังการแตกตาใบ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นช่วงอายุในระหว่าง 1 – 15 วัน, 16 – 30 วัน และ 46 – 60 วัน ให้รูปแบบของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เหมือนกัน

นิยะดา (2539) ทำการจำแนกพันธุ์เข็มโดยใช้เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส จากการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ทั้ง 4 ชนิด คือ peroxidase, esterase, acid phosphatase และ alcohol hydrogenase จากดอกบาน ใบอ่อน และใบแก่ ของต้นเข็ม 12 พันธุ์ โดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ามีเพียงรูปแบบไอโซไซม์ของ peroxidase เท่านั้น ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ และพบว่ามีบางพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างกัน แต่มีรูปแบบของไอโซไซม์เหมือนกัน แถบสีที่ปรากฏมีค่าอัตราการไหล (R_f) อยู่ในช่วง 0.61 – 0.81 และพบว่าส่วนของต้นเข็มที่แตกต่างกัน จะมีปริมาณของไอโซไซม์ peroxidase ที่แตกต่างกัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันของจำนวนและตำแหน่งของแถบสีที่ปรากฏไม่มีความแตกต่างกัน

สุชาติ (2539) ทำการศึกษาไอโซไซม์อิเลคโทรโฟริซิสในหญ้าแฝกดอนและหญ้าแฝกหอม โดยใช้วิธีอิเลคโทรโฟริซิสชนิดเจลแป้ง จากเอนไซม์ 11 ชนิด ของหญ้าแฝกหอมจำนวน 8 accessions และหญ้าแฝกดอนจำนวน 11 accessions พบว่า เอนไซม์ที่ให้รูปแบบหลากหลายคือ เอนไซม์ DIA, G6PD, GOT, 6PGD,PGM และ SKD สำหรับเอนไซม์ที่มีเพียงรูปเดียวคือ GDH, IDH, LAP และ MDH สำหรับเอนไซม์ FDH ให้ผลการย้อมสีไม่ชัดเจน ดังนั้นการใช้ไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์หญ้าแฝกจึงควรเลือกใช้เอนไซม์ที่ให้รูปแบบที่หลากหลายอย่างน้อย 5 ชนิดคือ DIA, G6PD, GOT, 6PGD และ PGM ความแปรปรวนของแถบไอโซไซม์ภายใน accessions ของหญ้าแฝกดอนมีมากกว่าหญ้าแฝกหอม ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะการกระจายพันธุ์ของหญ้าแฝกทั้งสองชนิด

Obara *et al.*(1998)ได้ศึกษาเรื่องความหลากหลายของไอโซไซม์ในสปีชีส์ของ *Cymbidium* (Orchidaceae) นำเอนไซม์ 8 ระบบมาใช้ศึกษา electrophoretic ความแปรปรวนระหว่าง *Cymbidium* Swartz 12 specie และประเมินความสัมพันธ์ทาง phylogenetic สามารถเห็นความแตกต่างของชนิด (specie) อย่างง่ายๆ โดยเอนไซม์ที่ใช้ได้ผลคือ MDH,GPI อย่างไรก็ตามเอนไซม์ชนิดอื่นที่ผสมกันก็ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมชี้ให้เห็นถึงข้อมูลที่แสดงความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่าง 12 species

Young and David (1996) ได้ทำการพิสูจน์ยืนยันลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างชนิดของ Rosa (กุหลาบ) ด้วย isozyme โดยการศึกษาจากการประเมินการใช้ isozyme 3 รูปแบบ (acid phosphatase , malate dehydrogenase, phosphoglucose isomerase) ทั้งสามระบบไอโซไซม์ใช้ยืนยันถึงต้นกำเนิดลูกผสมระหว่างspecies พันธุ์ (ลูกผสมระหว่าง specie) ซึ่งวิธีการนี้ได้ผลถ้าหากรู้ความแตกต่างของ isozyme phenotype ของพ่อ-แม่ การพิสูจน์ต้นกำเนิดของ hybrid specie

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือสายพันธุ์ กับต้นกำเนิดของ hybrid นั้นใช้ isozyme ได้แต่มีขอบเขตโดยจำนวนของ generation ตั้งแต่ต้นกำเนิดที่มีการผสมพันธุ์และจำนวนสิ่งที่เพิ่มเข้าไปจากการตรวจสมมุติฐานพ่อ-แม่ของ specie ไอโซไซม์เป็นเครื่องมือที่ยอดเยี่ยมในการใช้ยืนยันถึงต้นกำเนิดของลูกผสมระหว่าง specie ได้รู้ถึงต้นกำเนิดและความแตกต่างกับความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันของแถบที่ตรวจพบที่ loci ในพวกที่ตรวจพบ ACP คือ ไอโซไซม์ส่วนใหญ่ที่วิเคราะห์สายพันธุ์กุหลาบลูกผสม

Mark *et al.* (1996) ศึกษาความแปรปรวนไอโซไซม์ในสายพันธุ์ purple Loosestrife (*Lythrum . sp*) นำ isozyme marker มาใช้ในการพิสูจน์ว่า purple loosestrife สายพันธุ์ต่างๆและพันธุ์ที่ผสมข้ามชนิดนั้นเป็นพันธุ์เดียวกันมาจากต้นกำเนิดเดียวกัน จากการตรวจจับ activity ของ isozyme PGM, PGI และ MDH พบว่า PGM และ PGI มีโซนของ activity 3 โซนด้วยกัน ส่วน MDH มี 2 โซน องค์ประกอบของ allelic ไม่สามารถบอกถึงคุณลักษณะได้ เนื่องจากว่า purple loosestife เป็น polyploidตามธรรมชาติ และความเป็นไปได้ของการผสมพันธุ์กันระหว่างสกุล (intergenic) นำปัจจัยความเหมือนกันทางพันธุกรรมมาใช้ประเมินระดับความใกล้ชิดระหว่างสายพันธุ์ purple loosestife จากการวิเคราะห์เป็นกลุ่มบ่งชี้ว่าทั้ง 7 สายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจาก L.*salicaria* L. ไม่แสดงความแตกต่างจาก 8 สายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจาก L.*virgatum* L. แสดงว่าอาจเป็นได้ว่าข้อจำกัดของการวิเคราะห์ isozyme เพื่อหาความแตกต่างของสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับต้นกำเนิดของสปีชีร์ด้วย แต่มี 2 สายพันธุ์ (จาก 8 สายพันธุ์) คือ ' Morden Gleam' และ ' Morden rose' สามารถแยกออกจาก L.*salicaria* L. โดยการแสดงออกของไอโซไซม์ได้ ข้อเสนอแนะของผลการทดลองนี้คือ ไอโซไซม์อาจใช้เป็นประโยชน์ เพื่อระบุความแตกต่างที่เป็นลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ ถ้ามีการเสริมระบบไอโซไซม์ก็สามารถแยกความแตกต่างได้ สายพันธุ์ 'Robert' ปรากฏรูปร่างลักษณะเป็น heterogeneous และสามารถแยกความแตกต่างได้ ขึ้นอยู่กับรูปแบบของไอโซไซม์ สองโคลนของ 'Stichflamme' มีลักษณะไอโซไซม์ที่แตกต่างบ่งชี้ว่าขาดความสมบูรณ์ของโคลน 14 จาก 16 สายพันธุ์ สามารถแยกได้โดย PGM, PGI และ MDH สายพันธุ์ Morden Glean, Morden Rose ไม่สามารถแยกความแตกต่างโดยใช้ไอโซไซม์ทั้งสามระบบ สายพันธุ์เหล่านี้เป็น fullsib ได้จากการผสมข้ามของ 'Modern Pin X L.*alatum* ' ด้วยเหตุนี้จึงคาดได้ว่ามีความแตกต่างที่ loci บางสมมุติฐานและมีความเด่นชัดสามารถแยกลักษณะสำคัญของสายพันธุ์ดังกล่าว ระบบไอโซไซม์ที่ใช้แต่ละระบบให้การประเมินผลเป็น zone ของ activity มากกว่า 1 โซน โซนเหล่านี้น่าจะบอกถึงความต่างกันของ loci PGI ให้ผลเป็น 12 แถบใน 3 โซน Purple loosestrife แต่ละสายพันธุ์สามารถให้ความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับรูปแบบของแถบไอโซไซม์ อย่างไรก็ตามความแปรปรวนในระหว่างโคลนแต่ละท่อนพันธุ์ต้องมีความแตกต่างที่เฉพาะซึ่งพิสูจน์และรับรองได้อย่างแท้จริง การวิเคราะห์ไอโซไซม์อาจให้ข้อมูลที่มีคุณค่าที่คำนึงถึงความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลากหลายทางพันธุกรรมที่ปรากฏใน purple loosestife เอนไซม์ 3 ระบบให้ allozyme ที่เป็นประโยชน์ เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในประชากรของวัชพืช purple loosestife ประชากรเดิม (native population) ของ L.*alatum* และสายพันธุ์ L.*salicaria* และ L.*virgatum* ประชากรวัชพืชของ L.*salicaria* และ L.*virgatum* มีความเหมือนกันทางพันธุกรรม ซึ่งทั้งสองอาจจะมีความเกี่ยวข้องกันในวิวัฒนาการของวัชพืช purple loosestife ใน United State

Hongwen *et al.* (1997) ใช้รูปแบบต่างๆของไอโซไซม์เพื่อจำแนกและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในสายพันธุ์ pawpaw (*Asimina trilobc* (L.) Dunal)

Maurcen and Thomus. (1999) ทำการจำแนกสายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม ในการรวบรวมเชื้อพันธุ์จากต้นแม่ของ *Hatiora sp.* (Cactaceae) โดยการใช้ไอโซไซม์

นอกจากวิธีการใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์เพียงอย่างเดียวแล้ว ยังได้ใช้วิธีอื่นร่วมด้วย เช่น Ettore *et al.*(1996) ได้ใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์ร่วมกับ Canonicial Discriminant Analysis (CDA) ในการจำแนกเชื้อพันธุ์ของ Pistachio (*Pistacia vera*L.) ซึ่ง CDA ใช้วัดลักษณะของตา , ใบ และผล ได้ผลดีเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ไอโซไซม์จากตัวอย่างใบพืช การใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันจะช่วยเพิ่มความเป็นไปได้ของการจำแนกลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์เพศเมีย

Charles and Dennis. (1997) ศึกษาสมมุติฐาน hybridของ Cherokee rose พันธุ์ ' Silver Moon ' และพันธุ์ 'Anemone ' โดยใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์กับ RAPD (Randomly Amplified Polymorphic) ซึ่งทั้งสองวิธีการให้ผลที่สอดคล้องกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และสารเคมี

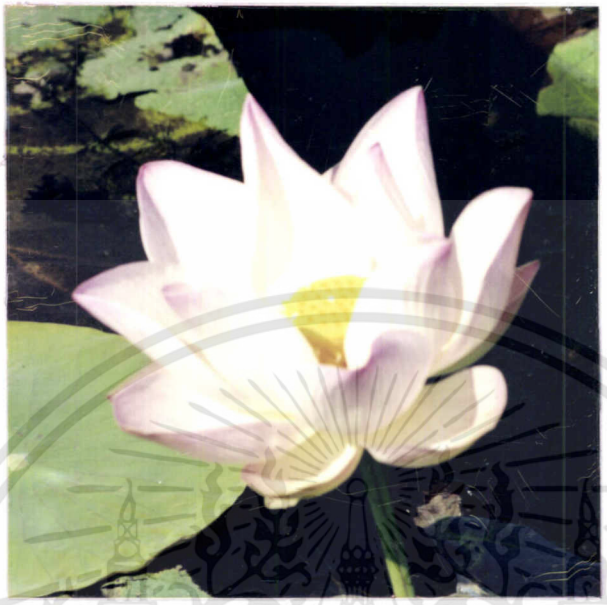
อุปกรณ์

1. พืชทดลอง บัวหลวงพันธุ์ปทุม (รูปที่ 1) และพันธุ์สัตตบงกช (รูปที่ 2)ใช้ส่วนใบอ่อนและก้านอ่อน
2. เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิสแบบ slab gel
3. เครื่องให้กำเนิดไฟฟ้า (Power supply)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงสารแบบควบคุมความเย็นได้ (Refrigerated centrifuge)
5. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH – meter)
6. เครื่องชั่ง ชนิดวัดจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
7. เครื่องดูดอากาศ
8. โกร่ง
9. หลอดใส่ตัวอย่างพืช (ependoft)
10. micro pipette, pipette
11. เครื่องแก้วต่างๆ

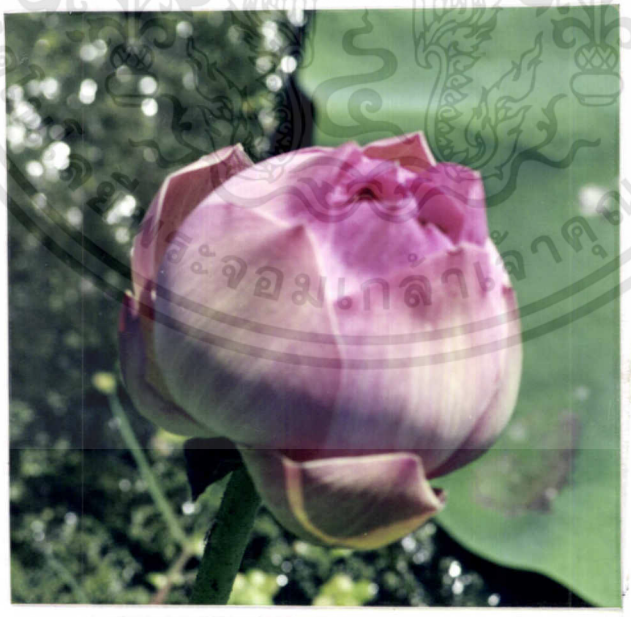
สารเคมี

1. Tris – HCl
2. Glycerine
3. β - mercaptoethanol
4. Polyvinylpyrrolidone (PVP)
5. Ethlenediaminebtetra-acitic acid (EDTA)
6. 1,4 - Dithio – DL – threitol (DTT)
7. Acrylamide
8. Ammonium peroxoddisulphate (APS)
9. N, N, N', N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)
10. α- naphtylacetate
11. β- naphtylacetate
12. O- dianisidine salf
13. Na-acetate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 บัวหลวงพันธุ์ปทุม



ภาพที่ 2 บัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. $CaCl_2$
15. Hydrogenperoxidase 3%
16. N,N-Dimethylformamide

วิธีดำเนินการ

1. การสกัดเอนไซม์

นำตัวอย่างพืชส่วนใบอ่อนและก้านอ่อน ล้างน้ำกลั่นให้สะอาด เช็ดให้แห้งและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปบดในโกร่งที่เย็นจัด เติมสารสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) โดยใช้อัตราส่วน1:2 ของน้ำหนัก เตรียม 50 ml ประกอบด้วย

0.1 M Tris-HCl	0.6057 g.
1 mM EDTA	0.0146 g.
0.5% PVP	0.25 g.
2 mM DTT	0.0154 g.
10 mM beta-mercaptoethanol	0.034 g.

และบดให้ละเอียด นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกเอาน้ำใสส่วนบน (supernatant) บรรจุใส่หลอด จำนวน 100 ไมโครลิตร และเติม example buffer (ประกอบด้วย glycerol และ bromophenol blue อัตราส่วน 850 ไมโครลิตร: 150 ไมครลิตร) จำนวน 20 ไมโครลิตร

2. การเตรียมแผ่นเจล

2.1 ประกอบชุดแผ่นกระจกสำหรับทำ slab gel

2.2 เตรียมสารละลายของเจล 10% (เจลส่วนล่าง) ที่ยังไม่ได้ polymerlize โดยผสมสารต่างๆดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด (ยกเว้น APS, TEMED) เข้าด้วยกัน นำไปดูดอากาศที่แทรกอยู่ในสารละลายออก โดยใช้ปั๊มความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงผสม APS และ TEMED ลงไปในสารละลายเจลที่ดูดอากาศออกแล้ว เทสารละลายเจลใส่ลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ แล้วค่อยๆหยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจลเพื่อรักษาผิวหน้าของเจลทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ประมาณ 20-30 นาที เมื่อเจลแข็งจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำ แล้วจึงดูดน้ำออก

2.3 เตรียมสารละลาย stacking gel 7.5 % (เจลส่วนบน) จำนวน 5 ml โดยผสมสารตามส่วน ดังนี้

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

เทส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น APS และ TEMED เข้าด้วยกันแล้วนำไปดูดอากาศพร้อมกับ separating gel ใส่ ASP และ TEMED ใน stacking gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว ผสมให้เข้ากันและเทลงบน separating gel สอด comb ลงใน gel ระวังอย่าให้ฟองอากาศเกิดขึ้นในช่องของ comb ทิ้งไว้ให้ gel แข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ดึง comb ออกจาก stacking gel หยอดน้ำกลั่นลงในช่อง ซึ่งเกิดภายหลังจากดึง comb ออก (well) เพื่อล้างช่องนั้น หลังจากนั้นดูดน้ำกลั่นออก จนเห็นช่องว่างเหล่านั้นชัดเจน

3. การแยกเอนไซม์

นำแผ่นเจล ที่เตรียมไว้ใส่ลงใน electrophoresis chamber ที่มีสารละลาย electrode buffer pH 8.3 buffer ประกอบด้วย 0.025 M Tris และ 0.192 M glycine ที่เย็น ทำการใส่สารตัวอย่างลงในหลุม (ช่องว่างที่ดึงหวีออกแล้ว) หลุมละ 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างละ 50ไมโครลิตร) เสร็จแล้วปิดฝาครอบ ต่อขั้วไฟฟ้า เข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ที่15 mA 150 V เมื่อสารมีลักษณะเป็นเส้นแถบจึงเปลี่ยนมาเป็น 25 mA นานประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนแถบเคลื่อนที่ลงมาห่างจากขอบล่างของเจลประมาณ 1 ซม.จึงปิดเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การตรวจจับเอนไซม์

การตรวจหาตำแหน่งเอนไซม์บนแผ่นเจล ทำโดยนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาแช่ในสารละลาย substrate ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ

- Esterase (EST) ประกอบด้วย

Tris HCl 0.1 M pH 7.0	25 ml
α- naphtylacetate	0.01 g
β- naphtylacetate	0.005 g
fast blue BB	0.03 g

ละลาย α- naphtylacetate กับ β- naphtylacetateด้วย acetone ก่อนนำสารทุกตัวมาผสมกัน (ใส่ fast blue BB ทีหลังสุดก่อนเทลงเจล) จากนั้นนำเจลไป incubate ในที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ 15-30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

- Peroxidasd (PRX) ประกอบด้วย

50 mM Na-acetate pH 5.0	25 ml
$CaCl_2$	25 mg
Hydrogenperoxidase	0.12 ml
3-amino-9-ethylcabazole	12.5 mg
N,N-Dimethylformamide	1.0 ml

นำสารทุกตัวผสมกัน จากนั้นเทลงบนเจลและนำไป incubate ในที่มืด อุณหภูมิห้องจนปรากฏแถบสีน้ำตาล จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

5. การอ่านผลการทดลอง

นำแผ่นเจลไปบันทึกภาพ เพื่อเก็บไว้เปรียบเทียบ ความแตกต่างของแถบเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น และวัดค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration ; R_f) ซึ่งวัดได้จาก

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

เพื่อนำไปเขียน Zymogram

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

วันและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาในการทดลอง

ตุลาคม 2543-เมษายน 2344

สถานที่ทำการทดลอง

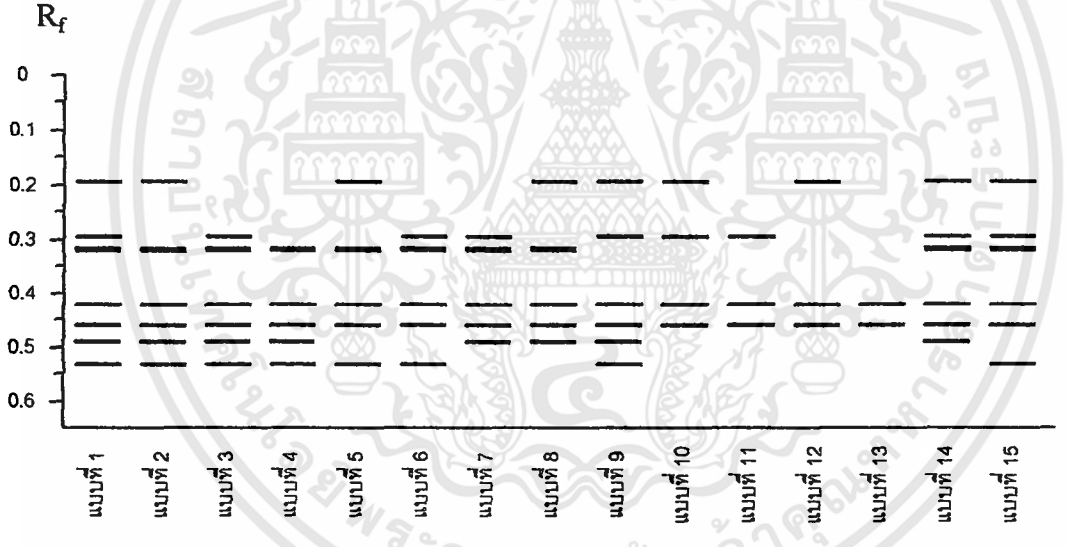
ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

41711

ผลการทดลอง

จากการศึกษาไอโซไซม์ของบัวหลวง 2สายพันธุ์ คือพันธุ์ปทุมและ พันธุ์สัตตบงกชใช้ชิ้นส่วนจาก ใบอ่อนและก้านอ่อนจากบัวหลวงพันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง นำมาตรวจดู activity ของไอโซไซม์ด้วยเอนไซม์ 2 ระบบคือ Esterase (EST) และ Peroxidase (PRX) ได้ผลดังนี้



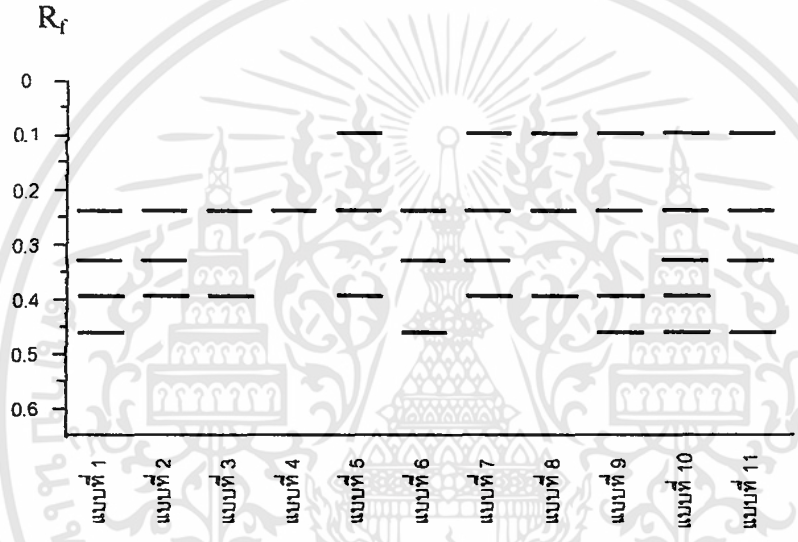
ภาพที่ 3 zymogram ของการตรวจจับ activity ของ EST

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบที่	พันธุ์ปทุม / จำนวนต้น	พันธุ์สัตตบงกช / จำนวนต้น
1	2	1
2	3	3
3	1	1
4	1	3
5	3	1
6	2	-
7	-	1
8	1	2
9	-	1
10	1	1
11	3	-
12	1	3
13	-	1
14	2	-
15	-	2

ตารางที่ 1 รูปแบบของไอโซไซม์ EST ที่พบในบัวหลวงพันธุ์ปทุมและ สัตตบงกช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 zymogram ของการตรวจจับ activity ของ PRX

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบที่	พันธุ์ปทุม / จำนวนต้น	พันธุ์สัตตบงกช / จำนวนต้น
1	2	2
2	1	2
3	-	1
4	2	-
5	1	1
6	-	1
7	6	4
8	2	4
9	2	1
10	2	3
11	2	1

ตารางที่ 2 รูปแบบไอโซไซม์ PRX ที่พบในบัวหลวงพันธุ์ปทุมและสัตตบงกช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการใช้สารสกัดเอนไซม์สามารถตรวจ activity ของ EST บัวหลวงพันธุ์ปทุมและสัตตบงกช เปรียบเทียบกัน จากภาพที่ 3 และตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่ารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอเรสของบัวหลวงทั้ง 2 พันธุ์ จะมีอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 0.19 – 0.53 มีจำนวนแถบอยู่ระหว่าง 2 – 7 แถบ

รูปแบบที่ 1 มีจำนวนแถบ 7 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.19, 0.29, 0.32, 0.42, 0.46, 0.49, 0.53

รูปแบบที่ 2 มีจำนวนแถบ 6 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.19, 0.32, 0.42, 0.46, 0.49, 0.53

รูปแบบที่ 3 มีจำนวนแถบ 5 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.29, 0.32, 0.42, 0.46, 0.49, 0.53

รูปแบบที่ 4 มีจำนวนแถบ 5 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.32, 0.42, 0.46, 0.49, 0.53

รูปแบบที่ 5 มีจำนวนแถบ 5 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.19, 0.32, 0.42, 0.46, 0.53

รูปแบบที่ 6 มีจำนวนแถบ 5 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.29, 0.32, 0.42, 0.46, 0.53

รูปแบบที่ 7 มีจำนวนแถบ 5 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.29, 0.32, 0.42, 0.46, 0.49

รูปแบบที่ 8 มีจำนวนแถบ 5 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.19, 0.32, 0.42, 0.46, 0.49

รูปแบบที่ 9 มีจำนวนแถบ 6 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.19, 0.29, 0.42, 0.46, 0.49, 0.53

รูปแบบที่ 10 มีจำนวนแถบ 4 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.19, 0.29, 0.42, 0.46

รูปแบที่ 11 มีจำนวนแถบ 3 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.29, 0.42, 0.46

รูปแบบที่ 12 มีจำนวนแถบ 3 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.19, 0.42, 0.46

รูปแบบที่ 13 มีจำนวนแถบ 2 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.42, 0.46

รูปแบบที่ 14 มีจำนวนแถบ 6 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.19, 0.29, 0.32, 0.42, 0.46, 0.49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบที่ 15 มีจำนวนแถบ 6 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.19, 0.29, 0.32, 0.42, 0.46, 0.53

การตรวจดู activity ของเอนไซม์ PRX มีอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 0.098 – 0.46 มีจำนวนแถบอยู่ระหว่าง 1 – 5 แถบ (ภาพที่ 2 และตารางที่ 4)

รูปแบบที่ 1 มีจำนวนแถบ 4 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.24, 0.33, 0.39, 0.46

รูปแบบที่ 2 มีจำนวนแถบ 3 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.24, 0.33, 0.39

รูปแบบที่ 3 มีจำนวนแถบ 2 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.24, 0.39

รูปแบบที่ 4 มีจำนวนแถบ 1 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.24

รูปแบบที่ 5 มีจำนวนแถบ 3 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.098, 0.24, 0.39

รูปแบบที่ 6 มีจำนวนแถบ 3 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.24, 0.33, 0.39

รูปแบบที่ 7 มีจำนวนแถบ 4 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.098, 0.24, 0.33, 0.39

รูปแบบที่ 8 มีจำนวนแถบ 3 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.098, 0.24, 0.39

รูปแบบที่ 9 มีจำนวนแถบ 4 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.098, 0.24, 0.39, 0.46

รูปแบบที่ 10 มีจำนวนแถบ 5 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.098, 0.24, 0.33, 0.39, 0.46

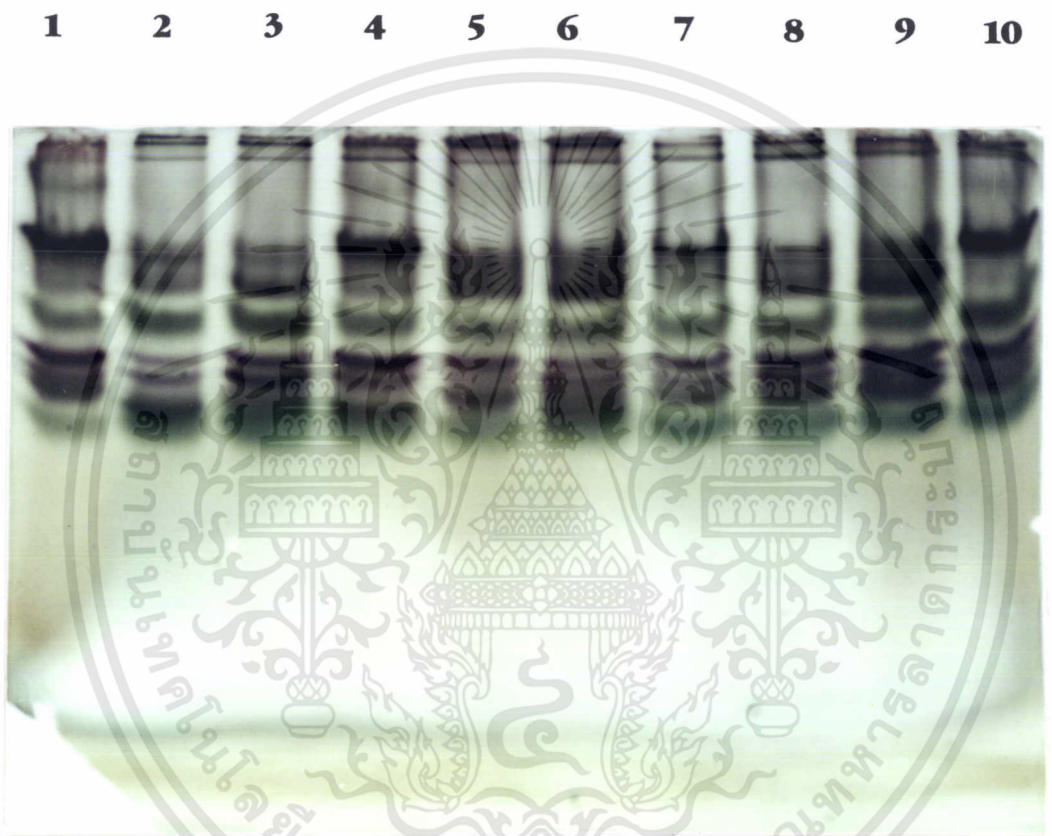
รูปแบบที่ 11 มีจำนวนแถบ 4 แถบ ค่าอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.098, 0.24, 0.33, 0.46

เอนไซม์ EST แยกความแตกต่างของบัวหลวงพันธุ์ปทุมจาก 20 ต้นได้ 11 clone (ตารางที่ 1) ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 2 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 3 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 4 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 5 จำนวน 3 ต้น, รูปแบบที่ 6 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 8 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 10 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 11 จำนวน 3 ต้น, รูปแบบที่ 12 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 14 จำนวน 2 ต้น และแยกความแตกต่างของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกชจาก 20 ต้น ได้ 12 clone ได้แก่ รูปแบบที่ 1จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 2 จำนวน 3 ต้น, รูปแบบที่ 3 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 4 จำนวน 3 ต้น, รูปแบบที่ 5 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 7 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 8 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 9 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 10 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 12 จำนวน 3 ต้น, รูปแบบที่ 13 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 15 จำนวน 1 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

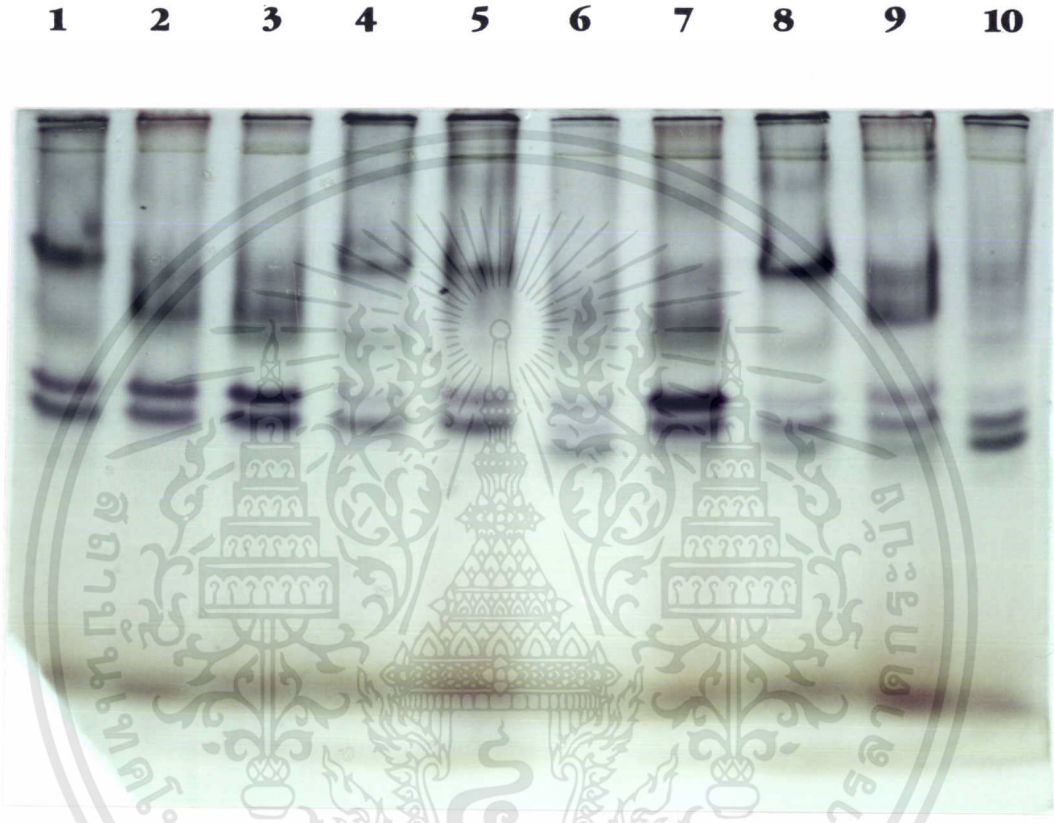
เอนไซม์ PRX แยกความแตกต่างของบัวหลวงพันธุ์ปทุมจาก 20 ต้นได้ 9 clone (ตารางที่ 2) ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 2 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 4 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 5 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 7 จำนวน 6 ต้น, รูปแบบที่ 8 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 9 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 10 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 11 จำนวน 2 ต้น และแยกความแตกต่างของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกชจาก 20 ต้นได้ 10 clone ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 2 ต้น, รูปแบบที่ 2 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 3 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 5 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 6 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 7 จำนวน 4 ต้น,รูปแบบที่ 8 จำนวน 4 ต้น, รูปแบบที่ 9 จำนวน 1 ต้น, รูปแบบที่ 10 จำนวน 3 ต้น และรูปแบบที่ 11 จำนวน 1 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



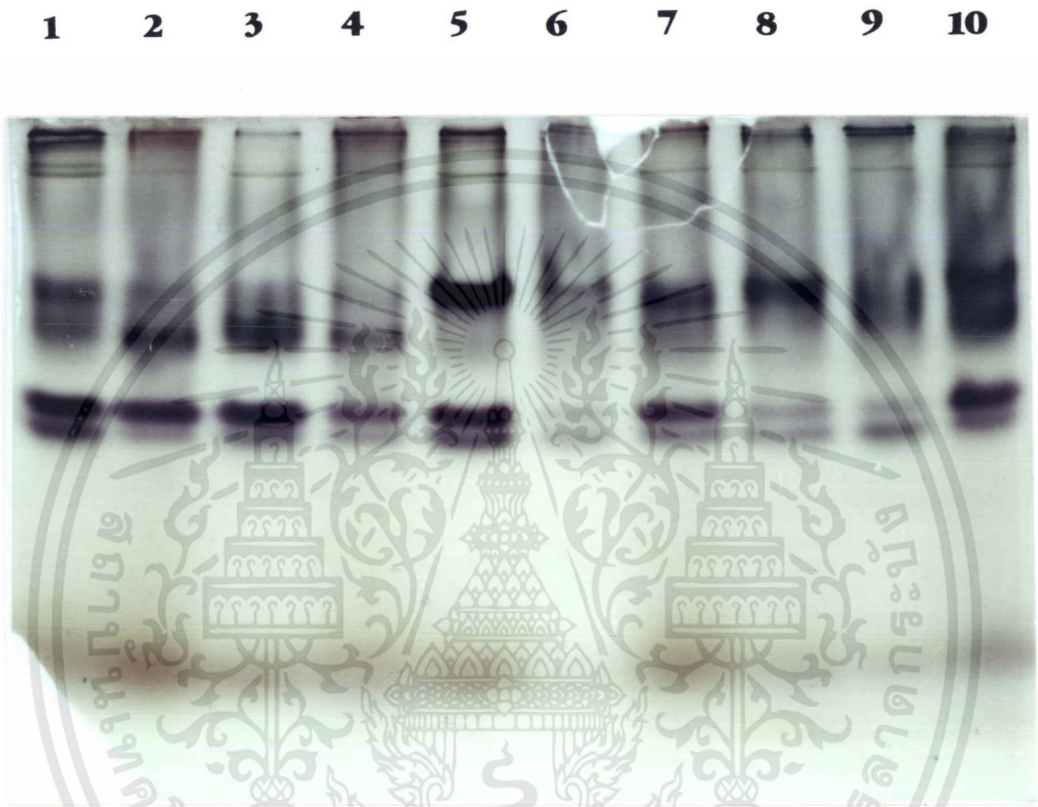
ภาพที่ 5 การแสดงออกของเอนไซม์ EST พันธุ์ปทุม คอลัมน์ที่ 1-4,6
พันธุ์สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 5, 7-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



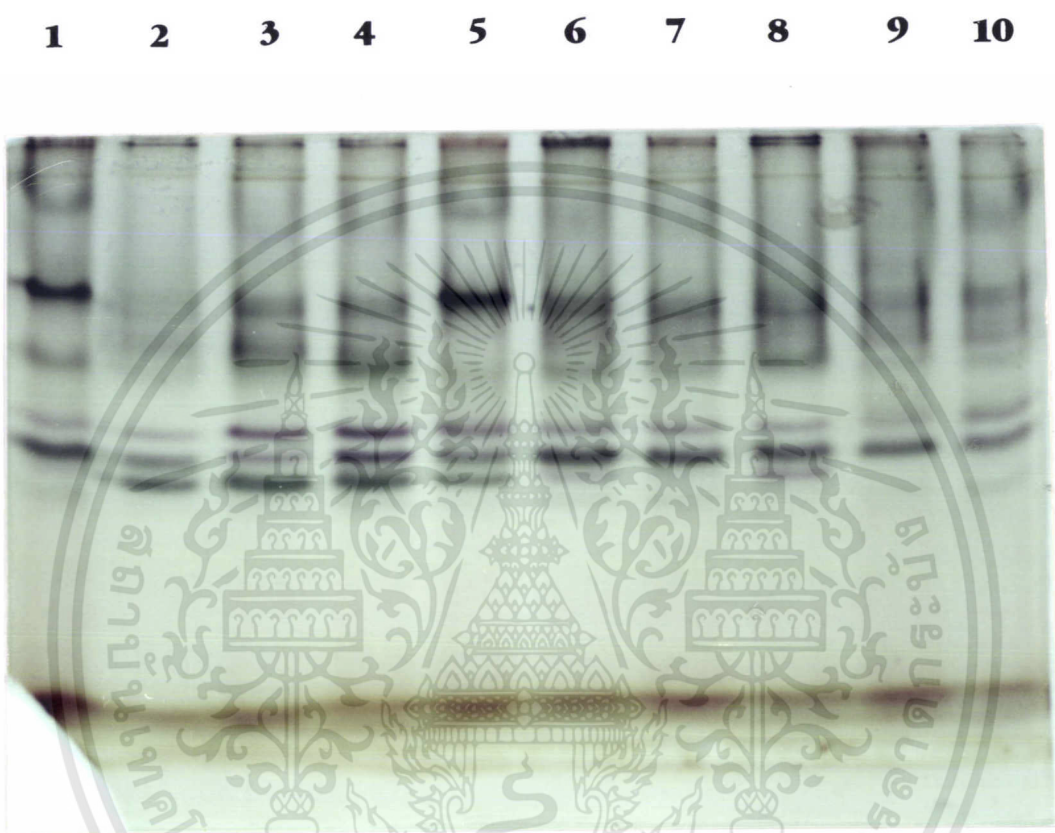
ภาพที่ 6 การแสดงออกของเอนไซม์ EST พันธุ์ ปทุม คอลัมน์ที่ 1 –5
พันธุ์ สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 6-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 การแสดงออกของเอนไซม์ EST พันธุ์ ปทุม คอลัมน์ที่ 1-5
พันธุ์ สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 6-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

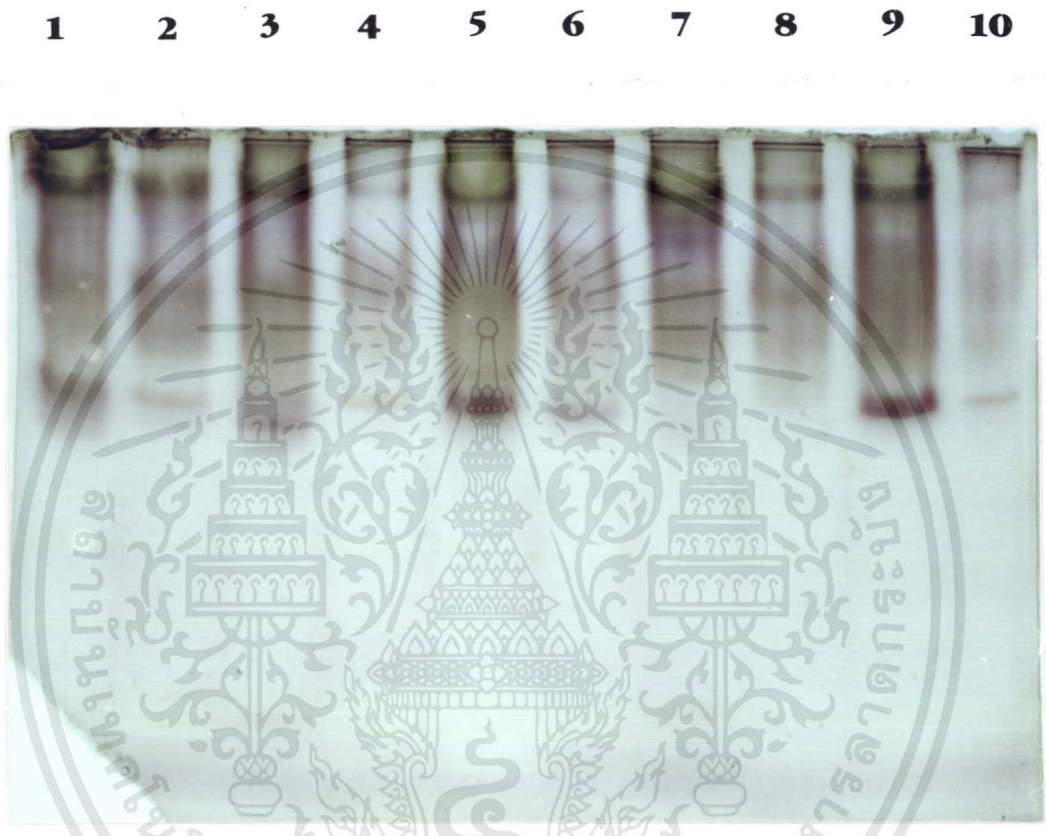


ภาพที่ 8 การแสดงออกของเอนไซม์ EST พันธุ์ ปทุม คอลัมน์ที่ 1-5
พันธุ์ สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 6-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

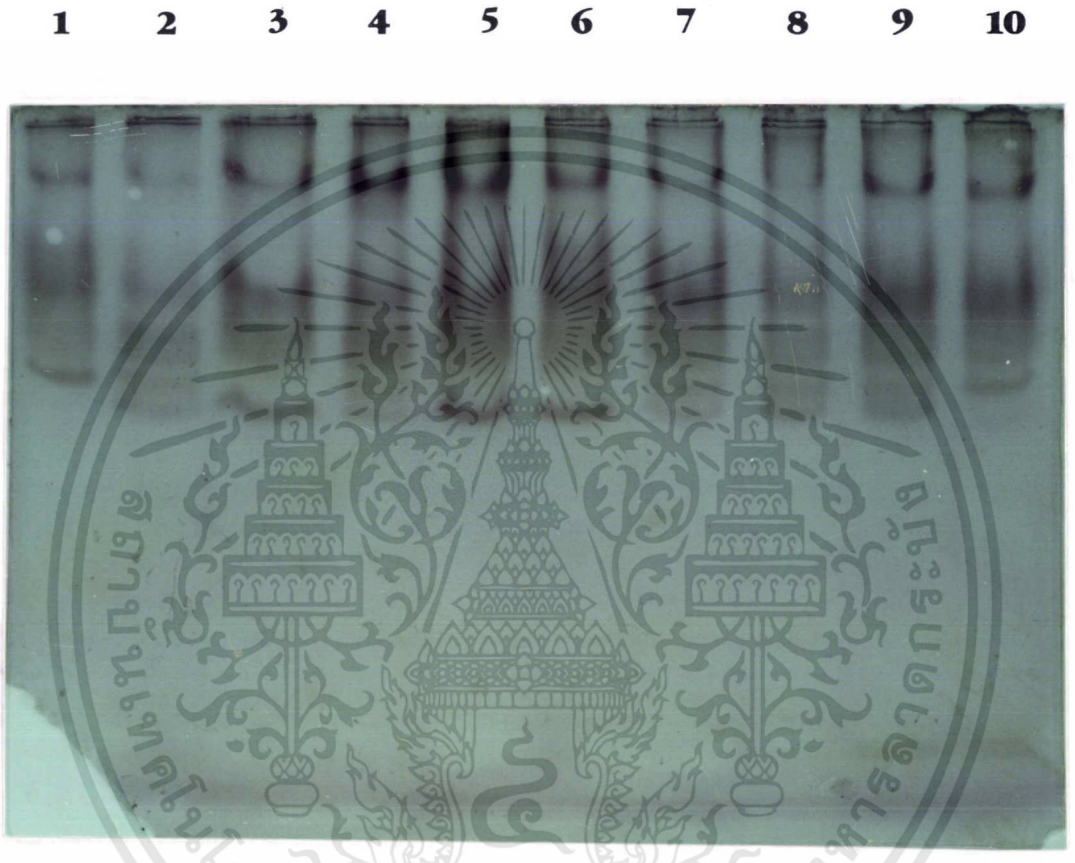
ภาพที่ 9 การแสดงออกของเอนไซม์ PRX พันธุ์ ปทุม คอลัมน์ที่ 1-4,6
พันธุ์ สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 5, 7-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 การแสดงออกของเอนไซม์ PRX พันธุ์ ปทุม คอลัมน์ที่ 1-5
พันธุ์ สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 6-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 การแสดงออกของเอนไซม์ PRX พันธุ์ ปทุม คอลัมน์ที่ 1-5
พันธุ์สัตตบงกช คอลัมน์ที่ 7-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจ activity ของเอนไซม์ทั้ง 2 ระบบคือ esterase และ peroxidase ปรากฏว่าทั้ง 2 เอนไซม์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของบัวหลวงทั้งสองพันธุ์ได้ เนื่องจากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 1 และ 2 พบว่ารูปแบบของไอโซไซม์บางรูปแบบนั้นพบได้ทั้งบัวหลวงพันธุ์ปทุม และพันธุ์สัตตบงกช ถึงแม้ว่าเอนไซม์ทั้งสองระบบจะไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างบัวหลวงสองสายพันธุ์ออกจากกันได้ แต่พบว่าในการตรวจ activity ของไอโซไซม์แต่ละระบบนั้นสามารถแยกความแตกต่างของบัวหลวงภายในกลุ่มพันธุ์เดียวกันได้ ดังนี้ เอนไซม์ EST แยกความแตกต่างของบัวหลวงพันธุ์ปทุมจาก 20 ต้นได้ 11 clone และแยกความแตกต่างของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกชจาก 20 ต้น ได้ 12 clone เอนไซม์ PRX แยกความแตกต่างของบัวหลวงพันธุ์ปทุมจาก 20 ต้นได้ 9 clone และแยกความแตกต่างของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกชจาก 20 ต้นได้ 10 clone

จากผลการทดลองที่ได้นั้น มีความสอดคล้องกับการศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์ไอโซไซม์ในการจำแนกพืชสกุลระกำโดยใช้เปอร์ออกซิเดส ไอโซไซม์ ที่ทำการสุ่มตัวอย่างในกลุ่มของระกำมา 10 ต้น พบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ที่ตรวจได้มีลักษณะต่างไป สามารถจำแนกระกำออกเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม (ศุจิรัตน์และคณะ. 2538) แต่อย่างไรก็ตามรูปแบบของไอโซไซม์ที่แตกต่างกันที่พบในเอนไซม์เพียง 1 หรือ 2 ระบบ อาจไม่เพียงพอในการที่จะใช้จำแนก clone หรือพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันมากๆ การจำแนกอาจจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ 10-20 ระบบหรือมากกว่า หรืออาจจะต้องศึกษาลึกไปถึงระดับของ DNA (ศิวพรและสุจิตรา. 2540) จากการที่เอนไซม์ทั้งสองระบบไม่สามารถแยกความแยกความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ของบัวหลวงพันธุ์ปทุม และพันธุ์สัตตบงกชได้นั้น อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ที่ใช้ตลอดจนตำแหน่งการควบคุมของยีน (สมศักดิ์. 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัญจนา แซ่เตียว และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. **การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ในเนื้อเยื่อต่างๆของต้นปทุมมา.**รายงานการประชุมทางวิชาการ ไม้ดอกไม้ประดับครั้งที่ 3 วันที่ 11-13 ธันวาคม 2540 ณ. โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์. เชียงใหม่

ชุติมา คงจรูญ. 2538. **การศึกษาไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบลำไยพันธุ์สีชมพู** .การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 1 สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. เชียงใหม่. หน้า 160-164

นิยะดา ตั้งสิรินิมิตร. 2539.ปัญหาพิเศษ. **การจำแนกพันธุ์เข็มโดยใช้เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส.** ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 13 หน้า

พาณิชย์ ยศปัญญา. 2540. **ไม้ตัดดอกเมืองร้อน.** สำนักพิมพ์มติชน. กรุงเทพฯ.187 หน้า

เพื่อนแก้ว หัสดิเสวี. 2529. ปัญหาพิเศษปริญญาโท: **การศึกษาลักษณะเอสเทอเรสไอโซไซม์ในมะละกอเพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และระหว่างเพศ.**ภาควิชาพืชสวน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

ศิวพร จินตนาวงศ์ และสุจิตรา จางตระกูล.2540.รายงานการวิจัย:**การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของมะม่วงโดยใช้เทคนิคของชีวเคมี.**ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี.จันทบุรี. 7 หน้า

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, สุภาพ สุนทรนนท์, สุขวัฒน์ จันทรปรรณิก และ อัมพิกา ปุ่นนจิต. 2538. **รายงานการวิจัย:การจำแนกเพศต้นกล้าสละโดยใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์.** ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี. จันทบุรี. 15 หน้า

สมศักดิ์ อภิสิทธิวานิช. 2541. หนังสือประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ: **การจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล.** ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต. ปทุมธานี. หน้า 83-95

สุชาติ ประทีปเมฆินทร์ . 2539. **วิทยานิพนธ์:การศึกษาไอโซไซม์อิเลคโทรโฟรีซิสในหญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis* A. Camus) และหญ้าแฝกหอม (*V. zizanioides* Nash).**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 46 หน้า

เสริมลาภ วสุวัต. 2537.**บัว: ไม้ดอกไม้ประดับ.** สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 297 หน้า

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537.**เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส.** สำนักพิมพ์รั้วเขียว. กรุงเทพฯ.106 หน้า

อรวรรณ ช้างพันธ์. 2543. ปัญหาพิเศษ:**การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวประดับ.** ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 44 หน้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Charles A. Walkwer, Jr., and Dennis J. Werner. 1997. **Isozyme and Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of Cherokee rose and Its Putative Hybrids ' Silver Moon ' and ' Anemone '** . J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122 (5): p. 659 –664

David E. McMillin. 1983. **Isozyme in Plant Genetics and Breeding, Part A** : Plant Isozyme . Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. p. 3-11

Ettore Barone, Luiji Di Marco, Francesco P. Marra, and Maria Sidari. 1996 . **Isozyme and Canonical Discriminant Analysis to Identify Pistachio (*Pistacia vera* L.) Germplasm** . Hort Science 31 (1) : p. 134-138

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

Mark S. Strefeler, Elizabeth Darmo, Roger L. Becker and Elizabeth J. Katovich. 1996. **Isozyme variation in Cultivars of Purple Loosestrife (*Lythrum sp.*)** . Hort Science 31 (2) : p. 279-282

Maureen C. O' Leary and Thomus H. Boyle. 1999. **Cultivar Identification and Genetic Diversity within a *Hatiora* (Cactaceae) Clonal Germplasm Copllection Using Isozyme** . J. Amer. Soc Hort. Sci.124 (4) : 373-376

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

Young – ju Kim and David H. Byrne. 1996. **Interspecific Hybrid Verification of *Rosa* with isozymes. Hort Science** . 31 (7) : 1207-1209

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้