
การจำแนกพันธุ์บัวอุบลชาติโดยการวิเคราะห์ไอโซไซม์

Varietal Identification of Water Lily by Isozyme Analysis

สุพัตรา ปทุมเมือง^{1/} และ วีณัน บัณฑิตย์^{1/}
Supatra Pathummuang^{1/} and Veeanan Bandit^{1/}

Abstract : Water lilies are open-pollinated plants, and therefore, characteristics of hybrids are varied. Identification of genetic variation was carried out on 10 species of *Nymphaea* sp. Electrophoretic method was used to determine isozyme patterns from mature and young leaves. Four enzyme systems; EST, SKD, GOT and POX were tested and applied for genetic identification of selected *Nymphaea* sp. They were able to identify the varieties. Unknown samples were tested using these 4 enzyme systems, some common bands from isozyme could be used as marker for identification of *Nymphaea* subgroups that were classified based on leaf characteristics.

Keywords: isozyme, electrophoresis, water lily

บทคัดย่อ : อุบลชาติเป็นบัวในสกุล *Nymphaea* เป็นพืชที่มีการผสมพันธุ์แบบเปิด จึงมีลูกผสมพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีลักษณะและสีสันทันแตกต่างกันออกไป ในการทดลองเพื่อศึกษารูปแบบของไอโซไซม์จากใบอ่อนและใบที่เจริญเต็มที่ของ *Nymphaea* spp. เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์อุบลชาติ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส นำตัวอย่างจำนวน 10 พันธุ์ มาศึกษารูปแบบไอโซไซม์ 4 ระบบ ได้แก่ EST, SKD, GOT และ POX และเมื่อนำระบบเอนไซม์ไปวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อในแต่ละกลุ่มของบัวพันธุ์ บัวฝรั่ง และบัวสาย พบแถบร่วมที่อาจนำไปใช้เป็น เครื่องหมายสำหรับการจำแนกกลุ่มได้

คำสำคัญ : ไอโซไซม์ อิเล็กโตรโฟรีซิส อุบลชาติ

^{1/} ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Horticultural, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

บัว เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ อยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae โดยกลุ่มอุบลชาติอยู่ในสกุล *Nymphaea* ประกอบด้วย บัวสาย บัวผัน บัวเผื่อน และบัวฝรั่ง Pagels (2000) ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของบัวในสกุล *Nymphaea* พบว่ามีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน เนื่องจากมีความหลากหลายจากการกลายพันธุ์และลูกผสมใหม่ๆ ที่เกิดขึ้น บัวอุบลชาติเป็นพืชล้มลุกมีอายุหลายปี พบได้ทั่วไปทั้งในเขตร้อน เขตอบอุ่นและเขตหนาว มีความหลากหลายทั้งในเรื่องสีสันของดอกและรูปร่างใบ เวลาในการบาน และลักษณะทางสรีรวิทยาต่างๆ บัวอุบลชาติที่ปลูกในประเทศไทยมีทั้งแบบที่เป็นชนิดยืนต้น (Hardy type) และชนิดล้มลุก (Tropical type) (เสริมลาภ, 2540) เนื่องจากประเทศไทยมีความเหมาะสมทางด้านสภาพแวดล้อมในการปลูกบัว ซึ่งสามารถปลูกได้ทั่วประเทศ สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดปี และมีต้นทุนในการผลิตต่ำ จึงมีการพัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจของชาติ (เสริมลาภ, 2546) อย่างไรก็ตาม ยังมีบัวลูกผสมในท้องตลาดจำนวนมากที่มีลักษณะคล้ายกัน แต่มีชื่อเรียกแตกต่างกัน หรือบางกรณีอาจมีชื่อเรียกเดียวกันแต่ลักษณะดอกและใบต่างกันออกไปทำให้ยากต่อการจำแนกพันธุ์

ไอโซไซม์ (isozyme) หมายถึงเอนไซม์ที่มีโครงสร้างได้หลายแบบในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ในเซลล์ หรือในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน และเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน แต่มีโครงสร้างของโมเลกุล สมบัติทางเคมี ทางฟิสิกส์ และการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าแตกต่างกัน จึงสามารถใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในการแยกโครงสร้างแบบต่างๆ ได้ (อาภัสสรา, 2537) และการย้อมเอนไซม์ที่ดี ช่วยให้เกิดรูปแบบของแถบที่ง่ายต่อการวิเคราะห์ ซึ่งรูปแบบของแถบจำนวน และค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ที่มีความแปรปรวนระหว่างต้นพืชสามารถนำไปใช้จำแนกพันธุ์หรือชี้บ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Shields *et al.*, 1983)

การประยุกต์ใช้ไอโซไซม์พบในงานทดลองหลายลักษณะ Protopapadakis and Yannitsaros (1994) ศึกษาทิวลิป 9 กลุ่มที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ทั่วประเทศกรีซ พบว่า การใช้ระบบเอนไซม์ EST ให้รูปแบบของแถบดีกว่า MDH ในการแสดงความแตกต่างของ

ประชากร การใช้ไอโซไซม์เพื่อสนับสนุนงานอนุกรมวิธาน Apavatjirut *et al.* (1999) พบว่า การใช้รูปแบบของไอโซไซม์ 8 ระบบสามารถแสดงความใกล้ชิดของกลุ่มปทุมมาพันธุ์เบาได้ Kumar *et al.* (1995) สามารถจำแนก Ber (*Zizyphus mauritiana* Lam.) 42 สายพันธุ์โดยใช้ไอโซไซม์ POX, α -amylase และ ACP ออกเป็น 15, 18 และ 18 กลุ่ม ตามลำดับ Vanijajiva *et al.* (2003) ศึกษา รูปแบบไอโซไซม์ POX, SOD, GDH และ MDH ใน *Boesenbergia* จากภาคใต้ของประเทศไทย พบว่า สามารถนำมาใช้เป็น molecular marker ในการจำแนกลักษณะพันธุ์ได้ อริยา และคณะ (2539) พบว่าสารสกัดจากใบที่ได้จากต้นอ่อนของมะนาวและมะกรูด อายุ 3 เดือนและต้นอายุ 1 ปีมีแถบสีของไอโซไซม์เหมือนกัน แถบสีของ POX ในมะนาวทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบและมะกรูดไม่แตกต่างกัน ส่วนแถบสีของ EST ให้ผลในการจำแนกที่ดีกว่าจึงใช้ในการจำแนกพันธุ์และตรวจสอบลูกผสม หรือสามารถนำไอโซไซม์ไปใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม Aradhya *et al.* (1995) ศึกษาความหลากหลายของไอโซไซม์ในลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) 49 พันธุ์โดยใช้ 8 ระบบเอนไซม์ โดยพบว่าที่ระดับความเหมือนทางพันธุกรรม 50% แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ และการเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์แสดงให้เห็นว่า พันธุ์ที่มีชื่อเฉพาะต่างๆ มีรูปแบบไอโซไซม์ที่แสดงออกของยีนต่างกัน และพันธุ์ที่เรียกชื่อต่างกันมีรูปแบบไอโซไซม์ที่มีลักษณะเฉพาะเหมือนกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์ บัวอุบลชาติโดยการวิเคราะห์ไอโซไซม์

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวอุบลชาติโดยใช้รูปแบบไอโซไซม์

เตรียมตัวอย่างใบอ่อนและใบเจริญเต็มที่ของบัวในกลุ่มอุบลชาติ 10 พันธุ์ ได้แก่ Colorado (C), Maroon Beauty (M), บัวสายไทยสีขาว (W), ชมพูชิลอน (CI),

Dauben (D), Sir Galahad (S), Sheryl Bryne (Sh), บัวผัน สีชมพู (P), นางกวัก (K) และ จงกลนี (J) สกัดเอนไซม์ด้วย น้ำยาสกัดสูตร 1 (1 M Tris-HCl Buffer pH 7.5, 0.5 M EDTA, 1 M $MgCl_2$, 2-mercaptoethanol และ PVP-40) และสูตร 2 (1 M Tris- HCl Buffer pH 8.5, sucrose และ 2-mercaptoethanol) และแยกขนาดโมเลกุลด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิส นำเจลมาทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อเอนไซม์ EST, SKD, GOT และ POX คัดเลือกเจลที่แสดงแถบได้ดีที่สุดของแต่ละเอนไซม์เพื่อศึกษารูปแบบจากจำนวนและ ตำแหน่งของแถบ คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) เพื่อทำไซโมแกรม และนำค่าการมีแถบสีและไม่มีแถบสีมา วิเคราะห์ผลด้วย UPGMA cluster โดยใช้โปรแกรมสำเร็จ รูปทางสถิติ SPSS release 6.0

การทดลองที่ 2 การศึกษารูปแบบจำเพาะที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของบัวอุบลชาติ

จัดกลุ่มใบอ่อนของบัวในกลุ่มอุบลชาติที่ไม่ทราบชื่อพันธุ์เป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัวอย่างตามลักษณะ

ของใบร่วมกับการบานของดอก คือ กลุ่มบานกลางวัน ดอกชูพื้นน้ำ ขอบใบจักมนไม่เป็นระเบียบ (บัวผัน) กลุ่ม ดอกบานกลางวัน ดอกลอยน้ำ ใบกลม ขอบใบเรียบ (บัวฝรั่ง) และกลุ่มดอกบานกลางคืน ขอบใบจักแหลม (บัวสาย) นำไปสกัดโดยใช้น้ำยาสกัดสูตร 1 และนำไปทำ อิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วคำนวณค่า Rf เพื่อทำไซโมแกรม

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

รูปแบบของไอโซไซม์ EST

เมื่อใช้น้ำยาสกัดสูตร 1 ในใบอ่อน ปรากฏแถบสี ม่วงแดงจำนวนมากมีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.57-0.77 แต่ใน พันธุ์ Colorado มีค่า Rf = 0.44 แยกออกไปอีกค่าหนึ่ง และเมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบที่ต่างกัน 10 รูปแบบ (ภาพที่ 1) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมที่ความต่าง 25% พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 2)

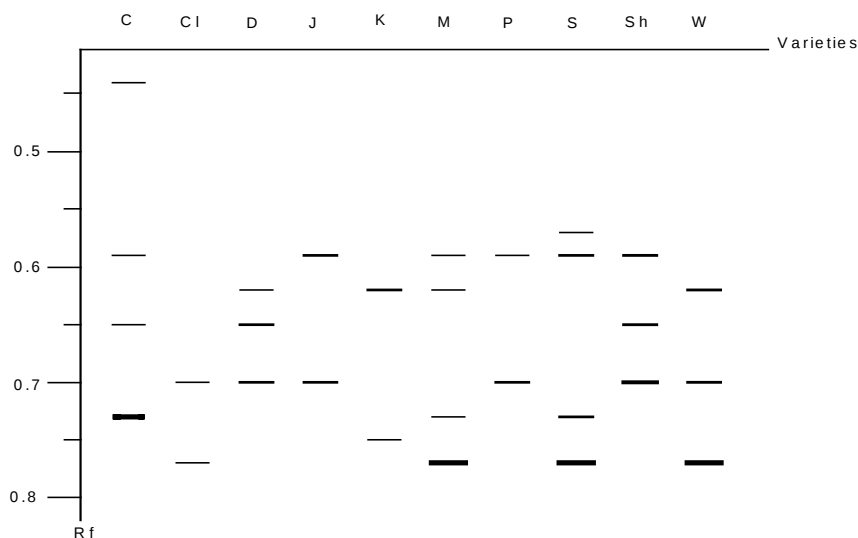


Figure 1 Zymogram of EST from young Leaf, extraction solution #1.

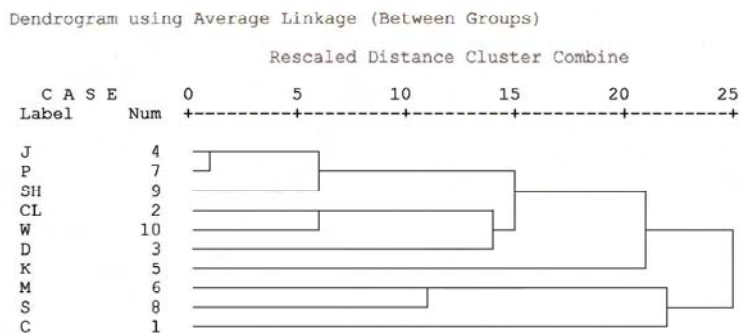


Figure 2 Dendrogram of EST from young leaf, extraction solution #1.

รูปแบบของไอโซไซม์ SKD

เมื่อใช้น้ำยาสกัดสูตร 2 ในใบอ่อน ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.51-0.78 และเมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบที่ต่างกัน 9 รูปแบบ โดย CI และ S มีรูปแบบ

ของแถบเหมือนกัน (ภาพที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ความต่าง 25% พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 4)

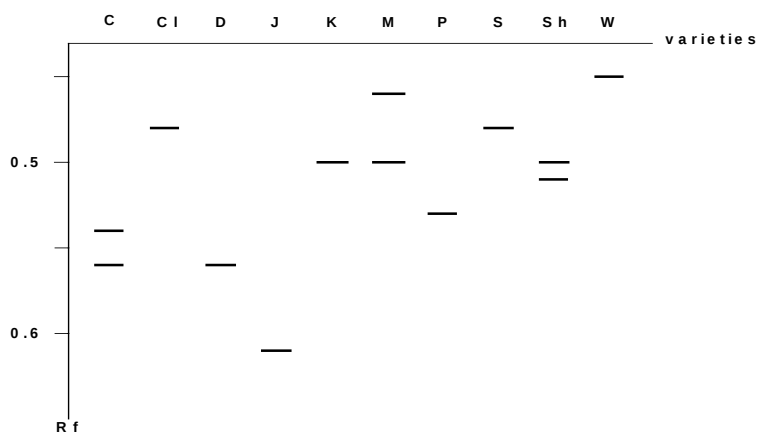


Figure 3 Zymogram of SKD from young Leaf, extraction solution #2.

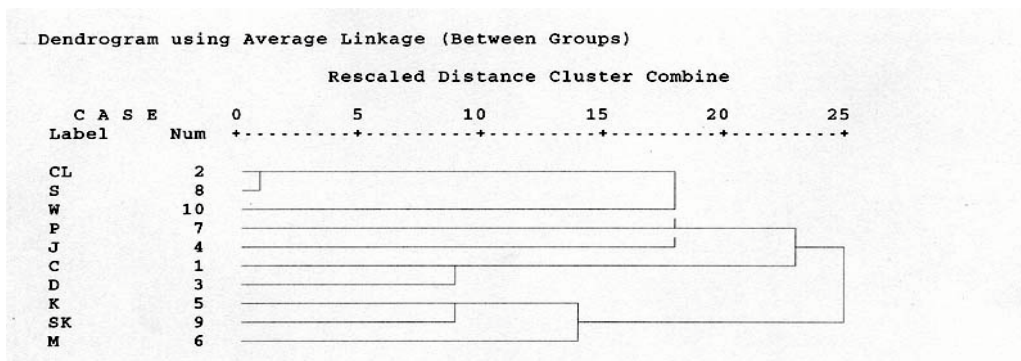


Figure 4 Dendrogram of SKD from young leaf, extraction solution #2.

รูปแบบของไอโซไซม์ GOT

เมื่อใช้น้ำยาสกัดสูตร 1 ในใบเจริญเต็มที่ปรากฏแถบเฉพาะพันธุ์ K 3 แถบ และพันธุ์ M 1 แถบ มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.17-0.31 ส่วนพันธุ์อื่นๆและในใบอ่อนไม่ปรากฏแถบ และเมื่อนำไปทำไซโมแกรม พบว่า มีรูปแบบที่ต่างกัน 2 รูปแบบ (ภาพที่ 5) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ความต่าง 25% พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 6)

รูปแบบของไอโซไซม์ POX

เมื่อใช้น้ำยาสกัดสูตร 1 ในใบเจริญเต็มที่ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.1-0.78 แต่ในบัวพันธุ์ C ปรากฏแถบเพิ่มเติม มีค่า Rf เท่ากับ 1 และ 1.2 และเมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่ามีรูปแบบที่ต่างกัน 10 รูปแบบ (ภาพที่ 7) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ความต่าง 25% พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 8)

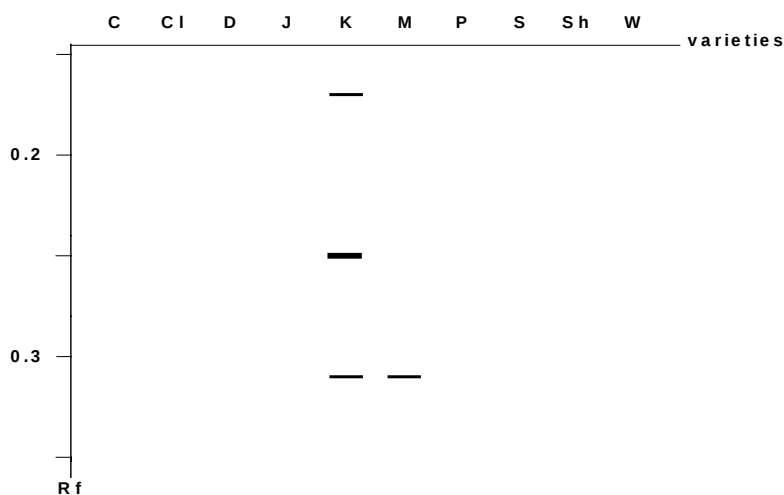


Figure 5 Zymogram of GOT from mature Leaf, extraction solution #1.

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

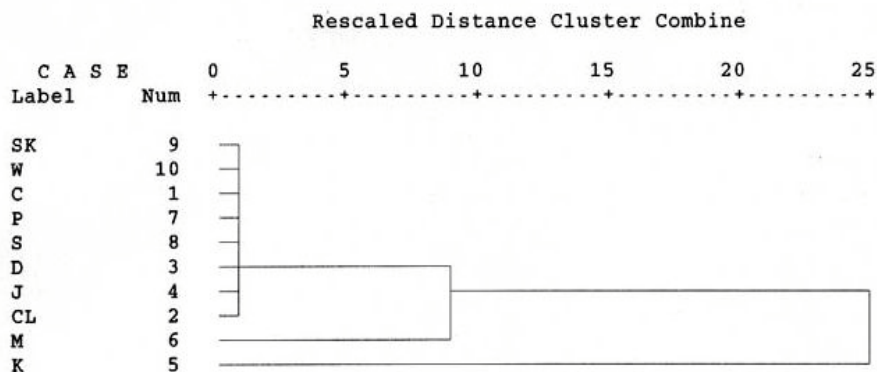


Figure 6 Dendrogram of GOT from mature leaf, extraction solution #1.

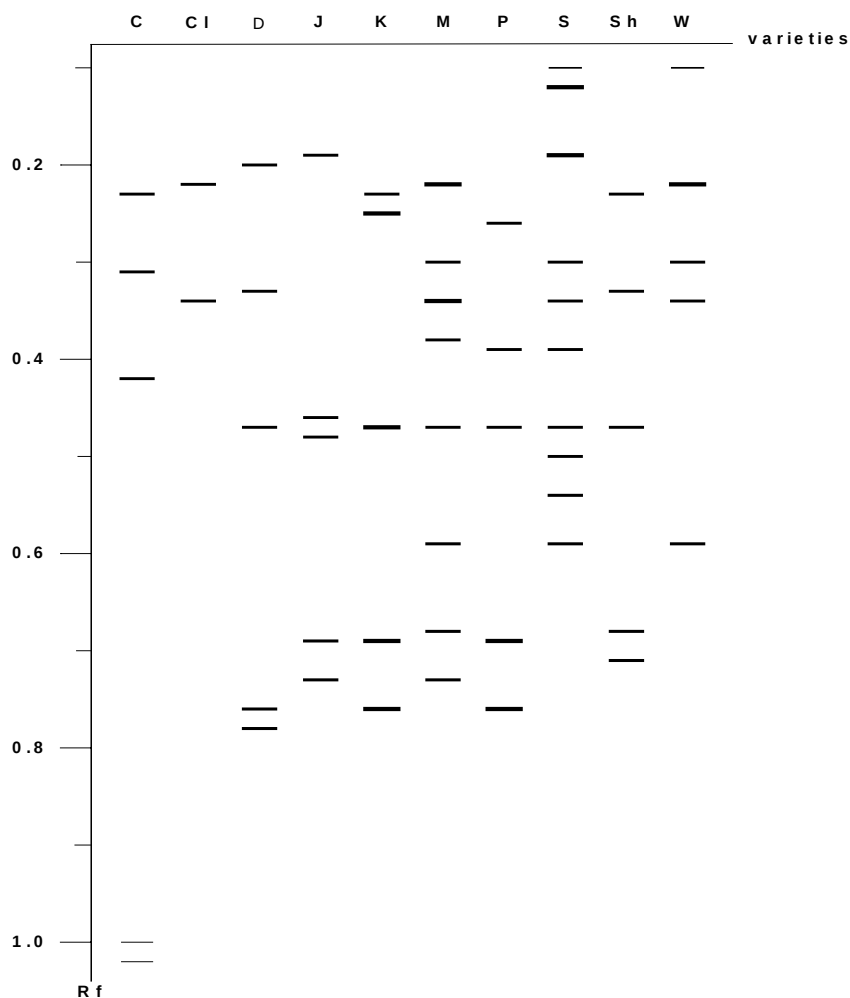


Figure 7 Zymogram of POX from mature Leaf, extraction solution #1.

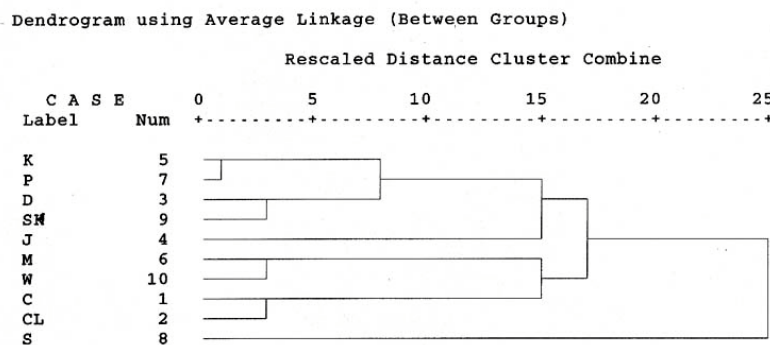


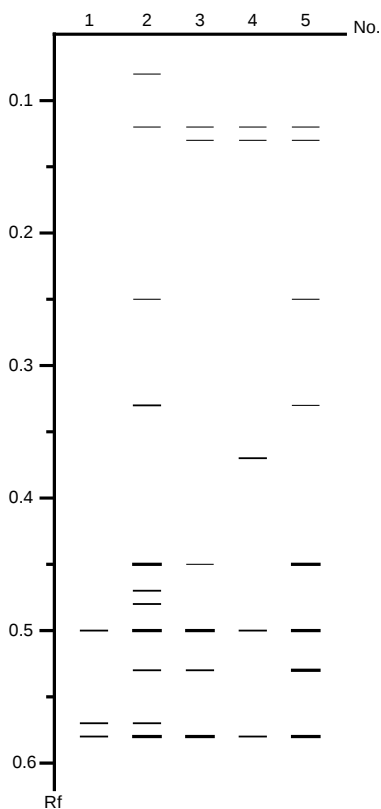
Figure 8 Dendrogram of POX from mature leaf, extraction solution #1.

การทดลองที่ 2

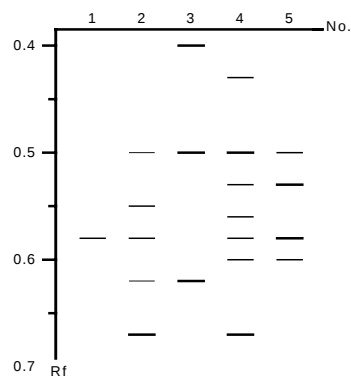
รูปแบบของไอโซไซม์ EST

กลุ่มบัวผัน ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.08-0.58 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบ (ภาพที่ 9A) กลุ่มบัวฝรั่ง ปรากฏแถบที่มีค่า Rf

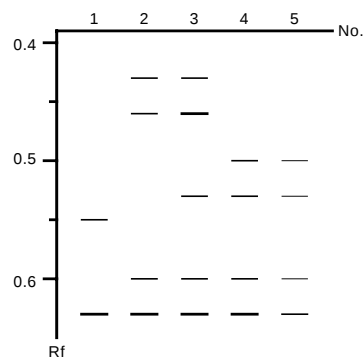
อยู่ในช่วง 0.4-0.67 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบ (ภาพที่ 9B) กลุ่มบัวสาย ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.43-0.63 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบแตกต่างกัน 4 รูปแบบ (ภาพที่ 9C)



A.1



B.1



C.1

Figure 9 Zymogram of EST from young leaf of (A.) 'Bua Phun' group
(B.) 'Bua Fa-Rang' group and (C.) 'Bua Sai' group.

รูปแบบของไอโซไซม์ SKD

กลุ่มบัวผัน ปรากฏแถบจำนวน 1-3 แถบ ที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.4-0.45 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบ (ภาพที่ 10A) กลุ่มบัวฝรั่ง ปรากฏแถบในตัวอย่างที่ 3 และ 4 มีจำนวน 2 แถบ และ 1 แถบ ตามลำดับ มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.42-0.45 และในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 5 ไม่ปรากฏแถบ เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบแตกต่างกัน 2 รูปแบบในตัวอย่างที่ 3 และ 4 (ภาพที่ 10B) กลุ่มบัวสาย ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.35-0.37 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบแตกต่างกัน 4 รูปแบบ (ภาพที่ 10C)

รูปแบบของไอโซไซม์ GOT

กลุ่มบัวผัน ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.19-0.33 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบต่างกัน (ภาพที่ 11A) กลุ่มบัวฝรั่ง ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.22-0.33 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบแตกต่างกัน 3 รูปแบบ (ภาพที่ 11B) กลุ่มบัวสาย ปรากฏแถบที่มีรูปแบบใกล้เคียงกันทั้ง 5 ตัวอย่าง มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.19-0.28 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่า มีรูปแบบที่ต่างกัน 2 รูปแบบ (ภาพที่ 11C)

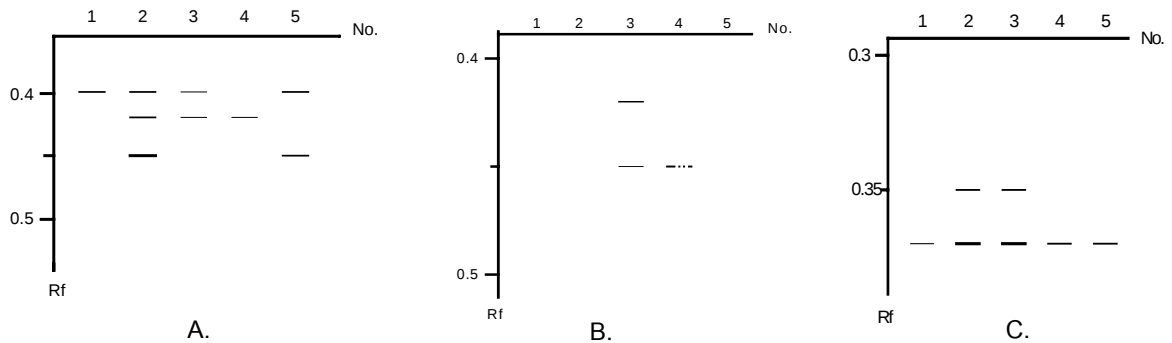


Figure 10 Zymogram of SKD from young leaf of (A.) 'Bua Phun' group (B.) 'Bua Fa-Rang' group and (C.) 'Bua Sai' group.

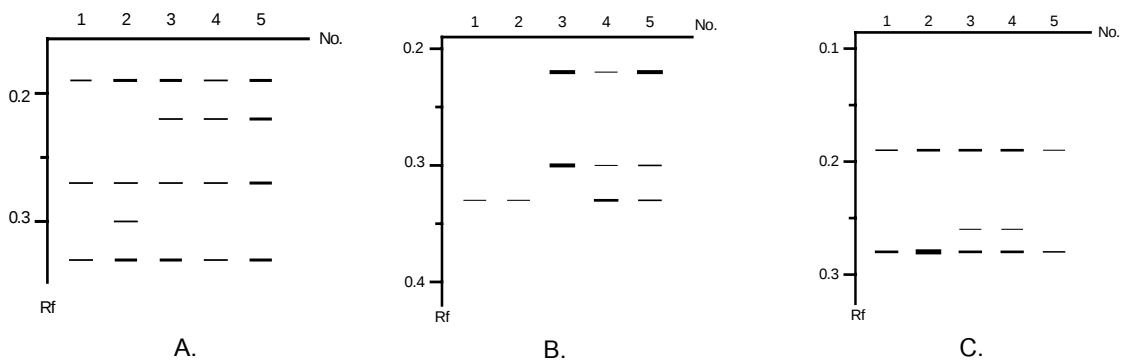


Figure 11 Zymogram of GOT from young leaf of (A.) 'Bua Phun' group (B.) 'Bua Fa-Rang' group and (C.) 'Bua Sai' group.

รูปแบบของไอโซไซม์ POX

กลุ่มบัวผัน ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.21-0.62 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่ารูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบ (ภาพที่ 12A) กลุ่มบัวฝรั่ง ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.17-0.8 เมื่อนำไปทำไซโมแกรมพบว่ารูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบ (ภาพที่ 12B) กลุ่มบัวสาย ปรากฏแถบที่มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.24-0.65 เมื่อ

นำไปทำไซโมแกรมพบว่ารูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบ (ภาพที่ 12C)

จากการทดสอบด้วยเอนไซม์ทั้ง 4 ระบบ สามารถรวบรวมแถบร่วมที่เกิดในกลุ่มตั้งแต่ 3 ตัวอย่างขึ้นไป (60%) โดยพิจารณาจากค่า Rf ที่เท่ากันภายในกลุ่มดังตารางที่ 1

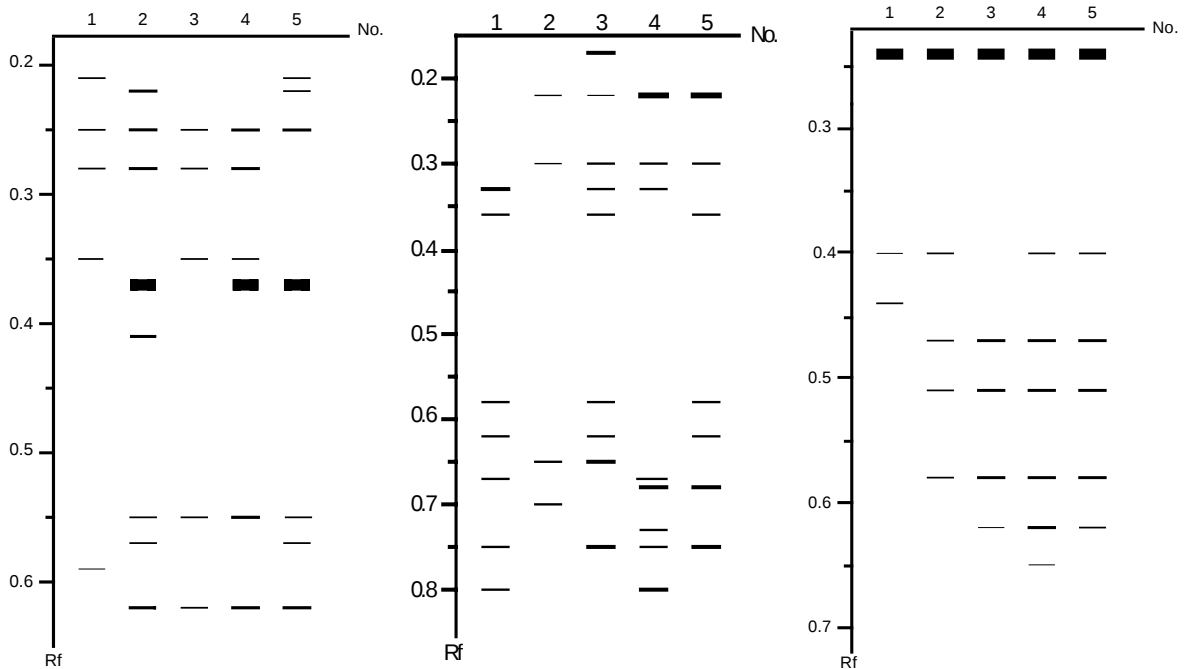


Figure 12 Zymogram of POX from young leaf extraction in 3 groups; (A.) 'Bua Phun' group (B.) 'Bua Fa-Rang' group and (C.) 'Bua Sai' group.

Table 1 Common bands from isozymes within *Nymphaea* subgroups.

Isozyme	Common Rf within subgroup		
	Bua Phun	Bua Fa-Rang	Bua Sai
EST	0.12	0.50	0.53
	0.13	0.58	0.60
	0.45		
	0.50		
	0.53		
	0.58		
SKD	0.40	no common band	0.37
	0.42		
GOT	0.19	0.22	0.19
	0.22	0.30	0.28
	0.27	0.33	
	0.33		
POX	0.25	0.22	0.24
	0.28	0.30	0.40
	0.35	0.33	0.47
	0.37	0.36	0.51
	0.55	0.58	0.58
	0.62	0.62	0.62
		0.75	

สรุปและวิจารณ์

ระบบเอนไซม์ EST, SKD, GOT และ POX แสดงรูปแบบของแถบในแต่ละระบบแตกต่างกัน สามารถนำไปใช้ในจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบัวได้ สำหรับแถบร่วมภายในกลุ่ม (monomorphic band) มีประโยชน์ในการจัดกลุ่มบัว แต่ละระบบเอนไซม์แสดงออกได้ดีในน้ำยาสกัดและตัวอย่างพืชที่ต่างกัน ระบบเอนไซม์ที่แสดงแถบได้ไม่ครบทุกพันธุ์ อาจเนื่องจากไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์นั้น (Jaaska, 1983) เมื่อนำลักษณะแถบที่ได้ไปจัดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการทำไฮโมแกรมและเดนไดรแกรม พบว่า แม้ยังไม่สามารถแยกกลุ่ม

อุบลชาติเป็น 3 กลุ่มย่อยตามลักษณะใบและการออกดอก ได้อย่างชัดเจนที่ระยะความต่างทางพันธุกรรม 25% แต่พบว่า บางระบบเอนไซม์มีแนวโน้มที่ดีในการจำแนกกลุ่มย่อย เช่น เมื่อใช้ EST พบว่า บัวสายทั้งหมดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือเมื่อใช้ POX พบว่า บัวผันและบัวสาย แยกกลุ่มจากกันชัดเจน

การศึกษารูปแบบจำเพาะที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวอุบลชาติภายในกลุ่มของบัวผัน บัวฝรั่ง และบัวสาย แต่ละระบบเอนไซม์มีรูปแบบของแถบใกล้เคียงกันภายในกลุ่ม และพบว่า ส่วนใหญ่มีแถบร่วมที่อาจนำไปใช้เป็น marker ในการจำแนกกลุ่มได้

เอกสารอ้างอิง

- เสริมลาภ วสุวัต. 2540. บัว: ไม้ดอกไม้ประดับ. บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 227 น.
- เสริมลาภ วสุวัต. 2546. พัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจของชาติ. 35 น. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง พัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจของชาติ 16-22 กรกฎาคม 2546. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- อริยา สาดรพันธุ์ อรดี สหวัชรินทร์ วิจิตร วังโน รวี เสริมภักดี และประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2539. การใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกสายพันธุ์และคัดเลือกลูกผสมในมะนาว. น 8-13. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 30 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2539.
- อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคอิเล็กทรอนิกส์. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 86 น.
- Apavatjirut, P., S. Anuntalabhochai, P. Sirirugsa and C. Alisi. 1999. Molecular markers in the identification of some early flowering *Curcuma* L. (Zingiberaceae) species. Ann. Bot. 84: 529-534.
- Aradhya, M. K., F. T. Zee and R. M. Manshardt. 1995. Isozyme Variation in Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). Scientia Horticulturae 63: 21-35. [Online]. Available <http://dbonline2.lib.cmu.ac.th/cabi/detail.nsp> (19 February 2004).
- Jaaska, V. 1983. Rye and triticale. p. 79-101. In S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding Part B. Elsevier Science Pub. B. V., Amsterdam.
- Kumar, S., V. P. Sharma and H. C. Kapoor. 1995. Isozymic identification of cultivars of ber (*Zizyphus mauritiana* Lamk. Hort. Sci. 70(2): 303-306.
- Pagels, W. 2000. Chromosome Counts of Waterlilies and Other *Nymphaeaceae*. [Online]. Available http://www.victoria-adventure.org/waterlilies/walter_chromosome_counts.html (19 February 2004).
- Protopapadakis. E. E., and A. Yannitssaros. 1994. Identification by isozymes of nine populations of *Tulipa* from Greece. Hort. Sci. 69(1): 11-14.
- Shields, C. R., T. J. Orton and C. W. Stuber. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. p. 443 – 468. In S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding Part A. Elsevier Science Pub. B. V., Amsterdam.
- Vanijajiva, O., W. Suvachittanont and P. Sirirugsa. 2003. Isozyme analysis of relationships among *Boesenbergia* (Zingiberaceae) and related genera in Southern Thailand. Biochemical systematics and ecology 31(5): 499-511.