



รายงานการวิจัย

การศึกษาและอนุรักษ์บัวหลวงราชินี

Study and Conservation of *Nelumbo nucifera* (Gaertn.)

นันทน์ภัส สุวรรณสินธุ์ บุษราคัม สิงห์ชัย และทรงศักดิ์ ธรรมจำรัส

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

โดยโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากการได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้ความร่วมมือของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและสถานที่แหล่งปลูกพันธุ์บัวหลวงราชินีที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บรวบรวมพันธุ์และตัวอย่างในการทำวิจัยในครั้งนี้ คุณค่าและประโยชน์ใดๆ อันเกิดจากงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครูอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน และเป็นเกียรติแก่มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

นันทน์ภัส สุวรรณสินธุ์ และคณะ

สารบัญ

บทที่	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป	ฎ
1 บทนำ	1
1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ทฤษฎี สมมติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ปัจจัยพื้นฐานในการปลูกบัว	6
2.2 การปลูกบัว	7
2.3 การให้น้ำ	7
2.4 การให้ปุ๋ย	8
2.5 การป้องกันกำจัดศัตรูพืชในบัวหลวง	8
2.6 การบังคับและควบคุมการออกดอกบัวหลวง	9
2.7 การเก็บดอก	9
2.8 การเก็บเกี่ยวฝักแก่	9
2.9 การตลาด	10
2.10 ประโยชน์ของบัว	10
2.11 หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์	11
2.12 องค์ประกอบสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์	12

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2.13 เครื่องหมายดีเอ็นเอ	12
2.14 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี (RAPD)	14
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
2.16 น้ำมันหอมระเหย	16
2.17 ปฏิกริยาออกซิเดชัน	19
2.18 แหล่งการเกิดอนุมูลอิสระ	19
2.19 ปฏิกริยาของอนุมูลอิสระ	20
2.20 สารต้านออกซิเดชัน	20
2.21 อนุมูลอิสระ DPPH	21
3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
3.1 การสำรวจเก็บและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินีในจังหวัดเพชรบุรี	23
3.2 การใช้วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์บัวหลวงราชินี	25
3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์	25
3.2.2 วิธีการดำเนินการทดลอง	25
3.3 ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงราชินี	25
3.3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	25
3.3.2 วิธีดำเนินการทดลอง	25
3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอบัวหลวง	26
3.3.4 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ	27
3.3.5 การปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ	27
3.3.6 ปฏิกริยาพีซีอาร์	28
3.3.7 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกริยาพีซีอาร์	28
3.3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล	28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.4 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวราชินีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	28
3.4.1 วัตถุประสงค์ของการทดลอง	28
3.4.2 ขอบเขตของการวิจัย	28
3.4.3 วิธีการทดลอง	29
3.4.4 เครื่องมืออุปกรณ์	29
3.4.5 ตอนที่ 1 การสกัดน้ำมันหอมระเหย	30
3.4.6 ตอนที่ 2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่อง GCMS	31
3.4.7 ตอนที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี DPPH	31
4 ผลการวิจัย	32
4.1 กิจกรรมที่ 1 การสำรวจเก็บและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี	32
4.1.1 การเก็บและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี	32
4.1.2 การสำรวจและศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงราชินี	32
4.1.3 การปลูกรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี	41
4.2 กิจกรรมที่ 2 การวิจัยเรื่องการใช้วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์บัวหลวงราชินี	43
4.2.1 ผลการทดลอง	43
4.3 กิจกรรมที่ 3 การจำแนกบัวหลวงในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรีด้วยเครื่องหมายโมเลกุล	47
4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอและการประเมินความเข้มข้นดีเอ็นเอ	47
4.3.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์พีดี (RAPD) และปฏิกิริยาพีซีอาร์	48
4.3.3 ผลการทดลอง	48
4.3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอและการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ	48
4.3.3.2 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	49
4.4 กิจกรรมที่ 4 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงราชินีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	53

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4.4.1.1 ตอนที่ 1 การสกัดน้ำมันหอมระเหย	53
4.4.1.2 ตอนที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของ น้ำมันหอมระเหยที่ใช้วิธีการสกัดแตกต่างกัน	53
4.4.1.3 ตอนที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี DPPH	56
4.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น	56
5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	58
5.1 ข้อเสนอแนะและการนำไปใช้ประโยชน์	62
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	66

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับบัวหลวง	22
3.1	สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต	29
3.2	เครื่องมือ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต	29
4.1	ค่าเฉลี่ยของความยาวก้านใบ เส้นรอบวงของก้านใบ (วัดจากโคนใบลงไป 50 ซม.) ความกว้างของใบ และจำนวนเส้นใบ	33
4.2	ค่าเฉลี่ยของความยาวก้านดอก เส้นรอบวงของก้านดอก (วัดจากโคนดอกลงไป 50 ซม.) เส้นรอบวงของดอก และความยาวของดอกบัวหลวงราชินี	35
4.3	ค่าเฉลี่ยจำนวนกลีบเลี้ยง จำนวนกลีบดอก จำนวนเกสรตัวเมีย และจำนวนเกสรตัวผู้ ของบัวหลวงราชินี	37
4.4	ค่าเฉลี่ยความยาวก้านฝัก เส้นรอบวงของก้านฝัก (วัดจากโคนฝักลงไป 50 ซม.) เส้นรอบวงของฝัก ความกว้างของฝักบัวหลวงราชินี	38
4.5	ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดดีต่อฝัก เส้นรอบวงของเมล็ด และความยาวของเมล็ด บัวหลวงราชินี	39
4.6	ค่าเฉลี่ยความสูง (ความยาวก้านใบ) ความกว้างใบ เส้นรอบวงของก้านใบ (วัดจากโคนใบลงไป 20 ซม.) และจำนวนใบของบัวหลวงราชินีอายุ 2 เดือน	44
4.7	ค่าเฉลี่ยความสูง (ความยาวก้านใบ) ความกว้างใบ เส้นรอบวงของก้านใบ (วัดจากโคนใบลงไป 20 ซม.) และจำนวนใบของบัวหลวงราชินีอายุ 4 เดือน	44
4.8	แหล่งที่มาของตัวอย่างบัวหลวงกลุ่มปทุม	47
4.9	แหล่งที่มาของตัวอย่างบัวหลวงกลุ่มอื่นๆ	47
4.10	แสดงความเข้มข้นของดีเอ็นเอบัว 19 ตัวอย่าง เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	49
4.11	ไพรมอร์และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างในบัวหลวง 3 สายพันธุ์แท้ และ 16 ตัวอย่างสุ่ม	51
4.12	ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวง	53
4.13	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยเอทานอล	54

4.14	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยไชเย็น	55
------	---	----

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.15	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยไชร้อน	56
4.16	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	57
4.17	ค่า IC ₅₀ ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลาย	57
4.18	ค่า IC ₅₀ ของวิตามินซี	57

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ดอกบัวหลวง	1
2.1 สายพันธุ์บัวหลวงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย	5
2.2 เหง้าบัวหลวงที่ใช้ปลูก	7
2.3 การแบ่งกลุ่มบัวหลวงที่มีดัชนีความเหมือนและสอดคล้องกับลักษณะกลีบดอก	16
2.4 สูตรโครงสร้างสารเคมีหลักในน้ำมันหอมระเหย	18
2.5 แหล่งการเกิดอนุโมลิสระ	19
2.6 กลไกปฏิกิริยาการเกิดลูกโซ่ของอนุโมลิสระ	20
2.7 สมการการเกิดออกซิเดชัน DPPH	21
3.1 แหล่งที่สำรวจเก็บข้อมูลและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี	24
3.2 แผนที่จังหวัดเพชรบุรี	26
4.1 ก้านดอก ก้านใบยาวมากกว่า 2 เมตร	33
4.2 ขนาดของใบใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 60 เซนติเมตร	34
4.3 ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงราชินี การพัฒนาของดอกจนเป็นฝักและติดเมล็ด	36
4.4 ดอกบัวหลวงราชินีตั้งแต่ดอกตูมจนดอกบานเต็มที่มีทั้งหมด 8 ระยะ	36
4.5 ลักษณะของกลีบดอก เกสรบัว รังไข่ การติดเมล็ด เมล็ดอ่อน และเมล็ดโตเต็มที่รับประทานได้	40
4.6 การถมดินและปรับพื้นที่สำหรับใช้ในการวางวงบ่อซีเมนต์	41
4.7 การเก็บสายพันธุ์บัวหลวงราชินีในหน้าแล้งสภาพน้ำแห้งและมีน้ำในฤดูฝนจากแหล่ง อำเภอยะย้อย	41
4.8 การเก็บสายพันธุ์บัวหลวงราชินีในสภาพน้ำตื้นและมีน้ำลึกจากแหล่งอำเภอยะย้อย	41
4.9 การเก็บสายพันธุ์บัวหลวงราชินีในสภาพน้ำลึกจากแหล่งอำเภอยะย้อย	42
4.10 การปลูกและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี	42
4.11 การปลูกเลี้ยงสายพันธุ์บัวหลวงราชินีในวงบ่อซีเมนต์	42
4.12 การเก็บรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินีทั้ง 8 แหล่งปลูก	43
4.13 การทดลองปลูกในวงบ่อซีเมนต์และศึกษาวัสดุปลูก 3 ชนิด อายุหลังปลูก 6 เดือน	45
4.14 สิ่งทดลองที่ 1 วัสดุปลูกเป็นดินเหนียวธรรมชาติคือดินนาทั่วไป	45

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.15 สิ่งทดลองที่ 2 วัสดุปลูกเป็นดินเหนียวที่ใช้ปลูกไม้หน้า	45
4.16 สิ่งทดลองที่ 3 วัสดุปลูกเป็นดินเหนียวที่ใช้ปลูกไม้หน้าผสมมูลโคอัตราส่วน 7 : 1	46
4.17 บัวหลวงราชินีปลูกในสระน้ำ	46
4.18 เดนโดรแกรม (dendrogram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างบัว (lotus) 19 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้เทคนิค RAPD	52

บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บรวบรวมข้อมูลบัวหลวงราชินีเพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์จากแหล่งปลูกทั้งหมด 8 แหล่งในจังหวัดเพชรบุรี โดยเก็บข้อมูลการพัฒนาของบัวหลวงราชินีจากแหล่งปลูกธรรมชาติ ตั้งแต่ ใบ ดอก ฝัก และเมล็ด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2558 ถึงเดือน กันยายน 2558 พบว่า บัวหลวงราชินี เป็นบัวสายพันธุ์หนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มบัวหลวงพุ่ม ซึ่งจากแหล่งอำเภอดำเนินสะดวกมีความยาวของก้าน ใบ ขนาดของก้านใบ เส้นรอบวงของดอก ความยาวของดอกและเส้นรอบวงของฝักใหญ่ที่สุดเท่ากับ 242.75, 5.45, 18.25, 12.50 และ 32.60 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยทุกๆ แหล่งปลูกที่เก็บข้อมูลพบว่า จำนวนกลีบดอก และเกสรตัวเมีย มีเกสรตัวผู้จำนวนมาก และความยาวของเมล็ด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องจากบัวหลวงราชินีจะเจริญเติบโตได้ดีในน้ำสะอาด ได้ทั้งน้ำลึกและตื้น หากน้ำลึกมากจะมีลำต้นค่อนข้างใหญ่ โดยเฉพาะฤดูฝน มีต้นสูงใหญ่ ดอกใหญ่ ฝักใหญ่ และรังไข่มาก

การใช้วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์บัวหลวงราชินี โดยทำการปลูกบัวหลวงราชินี ลงในวงบ่อซีเมนต์ ซึ่งมีวัสดุปลูกต่างกัน 3 ชนิด 1) ดินเหนียวที่เป็นดินนา 2) ดินเหนียว (ที่ใช้ปลูกไม้หน้า) และ 3) ดินผสม (ดินเหนียวที่ใช้ปลูกไม้หน้า : มูลโค ; 7 : 1) ทำ 3 ซ้ำๆ ละ 1 วงบ่อ ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) บันทึกความสูง ขนาดใบ จำนวนใบ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) การวิจัยครั้งนี้พบว่าการเจริญเติบโตของบัวหลวงราชินีในช่วง 1-2 เดือนแรกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การใช้ดินเหนียวที่ปลูกไม้หน้ามีแนวโน้มให้ความสูงและจำนวนใบมากกว่า หลังจากปลูกไปแล้ว 4 เดือนพบว่าการใช้ดินเหนียวที่ปลูกไม้หน้าทำให้มีก้านใบยาวที่สุดมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49.67 เซนติเมตร การวิจัยครั้งนี้พบว่าวัสดุปลูกไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของบัวหลวงราชินี สิ่งที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตคือน้ำ สำหรับดินผสม (ดินเหนียวที่ปลูกไม้หน้าผสมกับมูลโคอัตราส่วน 7 : 1) มีแนวโน้มให้ดอกเร็วกว่าวัสดุปลูกอื่นๆ เพราะหลังจากปลูกไปแล้ว 6 เดือนเริ่มให้ดอก

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงสายพันธุ์แท้ 3 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับบัวหลวง 16 ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดเพชรบุรี ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 159 หมายเลข พบว่าไพรเมอร์ 17 หมายเลขที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมบัวหลวง จำนวน 40 ตำแหน่ง และสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม สอดคล้องกับการแพร่กระจายของบัวหลวงตามลักษณะทางภูมิศาสตร์

ในการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงราชินีที่สกัด 3 วิธี ได้แก่การสกัดด้วยตัวทำละลาย ไชเย็นและไชร้อน ด้วยเครื่อง GC-MS: Electron, Ionization Acquisition mode; Scan 30-500 amu และเปรียบเทียบข้อมูล EI-MS ที่ได้ใน NIST library ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH โดยมีวิตามินซีเป็นสารควบคุม ผลการวิจัยพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลายจะมีสีน้ำตาลเข้มและเป็นของเหลวหนืด ส่วนการสกัดด้วยไชรเย็นทั้งสองวิธีเป็นของเหลวใส

สีเหลืองอ่อน และน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันเป็นส่วนใหญ่ สารที่พบทั้งในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลายและไซเ็นได้แก่สาร 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methylpyran-4-one และ lidocain ในปริมาณที่แตกต่างกัน สารที่พบทั้งในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลายและไซร่อนคือ ethyl palmitate โดยมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน น้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลายแสดงค่าการต้านออกซิเดชันสูงสุดด้วยค่า $IC_{50} \pm SD$ เท่ากับ $31.00 \pm 0.94 \mu\text{g/ml}$ ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยไซสัตัวไม่แสดงค่าการต้านออกซิเดชันที่ความเข้มข้นเริ่มต้น $125.00 \mu\text{g/ml}$ และวิตามินซีแสดงค่าการต้านออกซิเดชันด้วยค่า $IC_{50} \pm SD$ เท่ากับ $0.75 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$

คำสำคัญ: การสำรวจ การอนุรักษ์ บัวหลวงราชินี, เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอฟดี, น้ำมันหอมระเหย, องค์ประกอบทางเคมี, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Abstract

Survey and data collection of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (*N. nuccifera*) in order to study its characteristics had been done in eight production areas in Phetchaburi Province. Growth and development of leaf, flower, pod, and seed to *N. nuccifera* were collected from natural growing areas during March to September 2015.

Results showed that *N. nucifera* was a member of *N. nucifera* species. *N. nucifera* collected from Cha-am district had the longest leaf petiole, the largest size of leaf petiole, perimeter and width of flowers, and perimeter of pod as 242.75, 5.45, 18.25, 12.50, and 32.60 cm, respectively. In all observatory areas, *N. nucifera* was found to have large numbers of flower petal, pistil, and stamens. The length of seed had no significant differences. *N. nucifera* grew well in freshwater and in both shallow and deep water. In very deep-water, size of petiole was relatively big particularly in rainy season.

The suitable material for planting of *N. nucifera* was planted in cement pond with three different soils; 1) clay from cornfield, 2) clay for water-plant planting and 3) mixed soil between clay for water-plant planting and cow dung of ratio 7:1. In this research *N. nucifera* was planting in three replications with one pond per sample between May, 2015-october, 2015 at Faculty of Agricultural and Technology, Phetchaburi Rajabhat University. The research plans were using completely randomized design (CRD). The data were recorded in height, size and number of leaf. The analysis of statistic data were compared by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). This study found that the growth of this plant of all soils in the first 1-2 months was no significantly different, but *N. nucifera* planting with clay for water plant planting was tended to more height and number of leaf than other soils. After four months, *N. nucifera* planting with clay for water plant planting was showed the longest of leaf stalk with mean of 49.67 centimetrics in significantly statistically different at confident level 95 percentage. This research found that planting materials were no effect to the growth of *N. nucifera*, however, the key condition was water for mixed soil (clay for water plant planting and cow dung of ratio 7:1) was tended to more bloom than others, because after six month, the plant was bloomed.

The study of genetic diversity of three pure varieties of *N. nucifera* was compared with sixteen samples harvested from Phetchaburi province. The finger print of DNA was detected 159 primers by using random amplified polymorphic DNA technique (RAPD). This

research found that the 17th primer was showed 40 position differences and be grouping three groups, accordingly the plant distribution was based on geography.

The comparison of chemical constituents of three essential oils from different methods, including solvent, enfleurage and marcerated extractions was analysed by GC-MS: Electron, Ionization Acquisition mode; Scan 30-500 amu compared EI-MS data in NIST library. The antioxidation was study by DPPH method, using vitamin C as positive control. The research found that essential oil from solvent extraction was brown crude, and the both oils of extraction with goat fat were light yellow oil. Oils were most deferent constituents. 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methylpyran-4-one and lidocain were found different amount in both essential oils that extracted by solvent and enfleurage. Ethyl palmitate was constituted in similar amount in both solvent extraction and maceration. The antioxidation of the oil from solvent extraction was showed the best activities with $IC_{50} \pm SD$ of $31.00 \pm 0.94 \mu\text{g/ml}$. The others were showed no activities at $125.00 \mu\text{g/ml}$ and vitamin C was showed $IC_{50} \pm SD$ of $0.75 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$.

Keyword: Survey, Conservation, *Nelumbo nucifera*, RAPD (random amplified polymorphic DNAs), Essential oil, Chemical constituent, Antioxidation

บทที่ 1

บทนำ

บัวหลวงมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Nelumbo nucifera* Gaertn. (รูปที่ 1.1) อยู่ในวงศ์ Nelumbonaceae ชื่อสามัญ Lotus ชื่ออื่น บัว สัตบกษ สัตตบุษย์ อุบล (พร้อมจิต ศรีลัมพ์, วงศ์สถิต ฉั่วกุล และสมภาพ ประธานธรรารักษ์, 2548)



รูปที่ 1.1 ดอกบัวหลวง

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

บัวหลวง เป็นไม้น้ำมีอายุหลายปี ลำต้นมีทั้งเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน และเป็นไหลอยู่เหนือดินใต้น้ำ ลักษณะของเหง้าเป็นท่อนยาว มีปล้องสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเหลือง มีความแข็งเล็กน้อย หากตัดตามขวางจะเห็นเป็นรูปกลมๆ อยู่หลายรู โดยส่วนของไหลจะเป็นส่วนเจริญไปเป็นต้นใหม่ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินเหนียวในระดับน้ำลึก 30-50 เซนติเมตร และสามารถขยายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้เมล็ดหรือวิธีการแยกไหล มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย

ใบบัวหลวง ใบเป็นใบเดี่ยวรูปโล่ ใบอ่อนจะลอยปริ่มน้ำ ส่วนใบแก่แผ่นใบจะชูขึ้นเหนือน้ำ ลักษณะของใบเป็นรูปเกือบกลมและมีขนาดใหญ่ โดยมีขนาดประมาณ 50 เซนติเมตร ขอบใบเรียบและเป็นคลื่น ผิวใบด้านบนเป็นนวลเคลือบอยู่ ก้านใบจะติดอยู่ตรงกลางของแผ่นใบ ก้านใบมีลักษณะแข็งและเป็นหนาม หากตัดตามขวางจะเห็นรูอยู่ภายใน และก้านใบจะมีน้ำยาวสีขาว เมื่อหักก้านจะมีสายใยสีขาวๆ สำหรับใบอ่อนจะเป็นสีเทานวล ปลายจะม้วนงอขึ้นเข้าหากันทั้งสองด้าน

ดอกบัวหลวง ออกดอกเป็นดอกเดี่ยว มีสีขาว สีชมพู ดอกมีกลิ่นหอม ดอกมีกลีบเลี้ยง 4-5 กลีบ กลีบเลี้ยงมีขนาดเล็กและสีขาวอมเขียวหรือเป็นสีเทาอมชมพู ร่วงได้ง่าย ส่วนกลีบดอกจะมีจำนวนมากและเรียงซ้อนกันอยู่หลายชั้น ลักษณะของกลีบดอกเป็นรูปไข่กว้างประมาณ 5-6 เซนติเมตร และยาวประมาณ 7-9 เซนติเมตร เมื่อดอกบานเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 20-25 เซนติเมตร ในดอกจะมีเกสรตัวผู้สีเหลืองอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร และล้อมรอบอยู่บริเวณฐานรองดอกซึ่งมีลักษณะเป็นรูปกรวยหงาย หรือที่เรียกว่า “ฝักบัว” ที่ปลายอับเรณูจะมีรังไข่ค้ำยาระบบเล็กๆ มีสีขาว เกสรตัวเมียจะมีรังไข่ฝังอยู่ในฐานรองดอก เมื่ออ่อนเป็นสีเหลือง หากแก่แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว ช่องรังไข่จะเรียงเป็นวงบนผิวหน้าตัด มีจำนวน 5-15 อัน ส่วนก้านดอกมีสีเขียว ลักษณะยาวและมีหนามเหมือนก้านใบ โดยก้านดอกจะชูขึ้นเหนือน้ำและชูขึ้นสูงกว่าก้านใบเล็กน้อย ดอกบัวหลวงจะเริ่มบานในตอนเช้า โดยจะออกดอกและผลในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม

ฝักบัวหลวง ในฝักมีผลอ่อนสีเขียวนวลและมีจำนวนมาก ผลจะฝังอยู่ในส่วนที่เป็นฝักรูปกรวยในดอก ในรูปกรวยของดอกนั้นเมื่ออ่อนจะเป็นสีเหลือง เมื่อแก่แล้วจะขยายใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีเทาอมเขียว โดยจะมีผลสีเขียวอ่อนฝังอยู่ในฝักรูปกรวยเป็นจำนวนมาก

เมล็ดบัวหลวง ออกผลเป็นกลุ่มหรือที่เรียกว่าฝัก ลักษณะผลเป็นรูปกลมรี ผลอ่อนมีสีเขียวนวลและมีจำนวนมาก เมล็ดมีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ในเมล็ดมีติ้ว หรือต้นอ่อนที่ฝังอยู่กลางเมล็ดมีสีเขียว

ติ้วบัวหลวง คือ ส่วนของต้นอ่อนที่อยู่ในเมล็ดบัวหลวง ติ้วมีลักษณะคล้ายสาก มีความยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร มีใบอ่อน 2 ใบ ใบหนึ่งสั้น ส่วนอีกใบยาว ใบมีสีเขียวเข้มหรือสีเขียวอมเหลือง ปลายใบมีลักษณะม้วนเป็นรูปคล้ายลูกศร มีต้นอ่อนตรง ขนาดเล็กมากอยู่ระหว่างใบอ่อนทั้งสอง มีความยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร โคนต้นมีสีเหลืองอ่อนหรือเป็นสีเหลืองอมเขียว ลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกยาวประมาณ 2-4 มิลลิเมตร เนื้อหนาเปราะ รอยหน้าตัดจะมีรูเล็กๆ จำนวนมาก ติ้วมีรสขมจัด แต่ไม่มีกลิ่น (FRYNN.COM, 2016)

เนื่องจากเกสรบัวหลวงถูกนำมาใช้ประโยชน์ทั้งด้านเป็นยารักษาโรคและด้านความงามอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยการสกัดไอรอนและไชเย็นและยังไม่มีมีการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์และการสกัดด้วย

ไขมันมาก่อน ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยและการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้

บัวหลวงราชินี เป็นบัวสายพันธุ์หนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มบัวหลวงปทุมซึ่งบัวสายพันธุ์นี้มีลักษณะเด่นคือ ลำต้นสูงใหญ่ ก้านใบ และก้านดอกยาวประมาณ 2 เมตร ดอกมีสีชมพูขนาดใหญ่ กลีบดอกไม่ซ้อน มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ฝักใหญ่ มีรังไข่มาก และมีลักษณะประจำพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ ใบโตเต็มที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 - 60 เซนติเมตรใบไม่จับน้ำ ก้านใบ และก้านดอกแข็งสีเขียวเหลือบน้ำตาล ที่โคนก้านเหนือขึ้นมาจนถึงข้อใบเป็นสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเกือบน้ำตาล มีหนามสั้นเล็กๆ ทั่วทั้งก้าน (ปริมลภา วสุวัต และเสริมลาภ วสุวัต, 2548) ตามหลักฐาน และเอกสารต่าง ๆ ที่ปรากฏเชื่อว่า บัวหลวงราชินี มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่หมู่บ้านหนองบัว ตำบลหนองจอก อำเภอกำแพง จังหวัดเพชรบุรี ซึ่งบัวสายพันธุ์นี้เป็นบัวที่สมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถทรงโปรดให้มีการอนุรักษ์ไว้ และเมื่อปี พ.ศ. 2543 ทรงรับสั่งให้เจ้าหน้าที่ไปเก็บพันธุ์บัวที่พระองค์ทรงโปรดจากจังหวัดเพชรบุรีไปปลูกอนุรักษ์ที่ศูนย์การศึกษาพัฒนาพิภพทอง จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งบางครั้งบัวหลวงสายพันธุ์นี้อาจเรียกอีกชื่อ หนึ่งว่า บัวหลวงปทุมจากเพชรบุรี ตามแหล่งที่มีการค้นพบบัวสายพันธุ์นี้

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าบัวหลวงราชินีเป็นไม้ประดับที่ทรงคุณค่า และแฝงไปด้วยเรื่องราวที่น่าสนใจในบริบทของตัวเองและยังมีความเชื่อมโยงกับจังหวัดเพชรบุรี ในปัจจุบันบัวหลวงราชินีเริ่มมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น การเจริญเติบโตเป็นไปอย่างจำกัด การขยายพันธุ์หรือการแพร่พันธุ์ตามธรรมชาติเกิดขึ้นได้ช้า การถูกบุกรุกพื้นที่ เป็นต้น ซึ่งหากไม่มีการอนุรักษ์อย่างจริงจังจะทำให้มีแนวโน้มที่บัวหลวงราชินีอาจสูญพันธุ์ไปได้ คณะผู้วิจัยได้ตระหนักและเห็นความสำคัญของปัญหาดังกล่าวจึงได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ การเก็บรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินีเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและต่อยอดงานวิจัยบัวหลวงสายพันธุ์นี้ต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นการอนุรักษ์บัวหลวงราชินี และสามารถพัฒนาหรือฟื้นฟูแหล่งกำเนิดบัวสายพันธุ์ดังกล่าวให้มีความหนาแน่นมากขึ้น และเป็นการสนองพระราชประสงค์ของสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถในการอนุรักษ์บัวหลวงสายพันธุ์นี้ให้คงอยู่ตลอดไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อสำรวจและเก็บรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินีในจังหวัดเพชรบุรี ศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงราชินี ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงราชินี และน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงราชินี

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะดำเนินการเก็บและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี ศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ และการเจริญเติบโตของบัวหลวงราชินีที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรีเท่านั้น

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

บัวหลวงราชินีถ้ามีการนำมาปลูกในพื้นที่ หรือสภาพแวดล้อมอื่นๆ ที่ไม่ใช่ถิ่นเดิมมันสามารถให้ผลผลิต หรือมีคุณภาพที่แตกต่างหรือไม่ ซึ่งการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของ

บัวหลวงราชินีขึ้น ทำให้ทราบการจัดการในกรณีที่มีการนำบัวหลวงราชินีไปปลูกในสถานที่ หรือสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกับถิ่นเดิม บัวหลวงราชินี หรือบัวหลวงปทุมจากเพชรบุรี เป็นบัวหลวงปทุมสายพันธุ์หนึ่งในกลุ่มของบัวหลวงปทุมที่มีอยู่หลายสายพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นดี จึงมีความสำคัญเพื่อที่จะทราบความแตกต่างของสายพันธุ์ในกลุ่มบัวหลวงปทุม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับชาติ หรือนานาชาติ หรือการเสนอผลงานในที่ประชุมทั้งในและต่างประเทศเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชที่มีคุณค่า ตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีในโครงการ **อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)** ผลงานวิจัยนี้อาจได้รับการพัฒนาต่อเพื่อประโยชน์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี หากเป็นการส่งเสริมการปลูกพืชที่มีประโยชน์ในแถบพื้นที่ที่มีภูมิศาสตร์เหมาะสมเพื่อให้เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในระดับเศรษฐกิจ และที่สำคัญอาจนำไปสู่การพัฒนาอาชีพเพาะปลูกและสร้างรายได้ให้กับเกษตรกร มีแหล่งรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์บัวหลวงราชินี เพื่อใช้ในการพัฒนาพันธุ์ในอนาคต มีต้นพันธุ์ที่สามารถส่งเสริมให้กับเกษตรกรได้ ทราบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป และสามารถเผยแพร่ข้อมูลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อนักวิชาการเกษตรและผู้ที่เกี่ยวข้องได้

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

การเผยแพร่ดำเนินการโดย การตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ และสื่อสิ่งพิมพ์ต่างๆ เป็นแหล่งเรียนรู้ในพื้นที่จริง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ก้านใบ และก้านดอกแข็งมีตุ่มหนาม ส่งใบดอกชูพ้นน้ำ เป็นไม้้ำสกุลปทุมชาติ (*Nelumbo*) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน และอบอุ่น พันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย เป็นบัวหลวงสำหรับปลูกในพื้นที่ขนาดกลาง หรือขนาดใหญ่ มี 4 พันธุ์ คือ

1.1 ปทุม ผู้ปลูกเรียก “บัวแหลมแดง” ดอกแหลมสีชมพู หรือ ชมพูแดง กลีบดอกไม่ซ้อน

1.2 ปุณทริก หรือ บุณทริก ชื่อสามัญเรียก “บัวแหลมขาว” ดอกแหลมสีขาว กลีบดอกไม่ซ้อน

1.3 สัตตบงกช ผู้ปลูกเรียก “บัวฉัตรแดง” หรือ “บัวป้อมแดง” ดอกป้อมสีชมพู กลีบดอกซ้อนมาก

1.4 สัตตบุษย์ ชื่อสามัญเรียก “บัวฉัตรขาว” หรือ “บัวป้อมขาว” ดอกป้อมสีขาว กลีบดอกซ้อนมาก

และ ยังมีสายพันธุ์ที่มีการนำเข้ามาปลูกจากประเทศจีน ซึ่งเป็นบัวสายพันธุ์ที่มีขนาดเล็ก ดอกเล็กเหมาะสำหรับปลูกในภาชนะขนาดเล็ก เรียกว่า บัวปักกิ่ง บัวเข็ม หรือบัวไต้หวัน มี 2 สีคือ ขาว และ แดง (ชมพูเข้ม) (บ้านบัวปางอุบล, 2556)



ปทุม



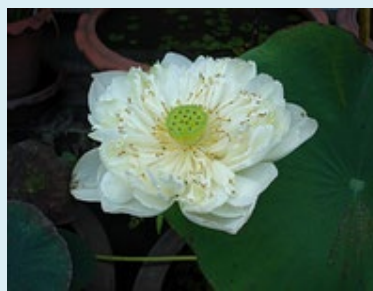
สัตตบงกช



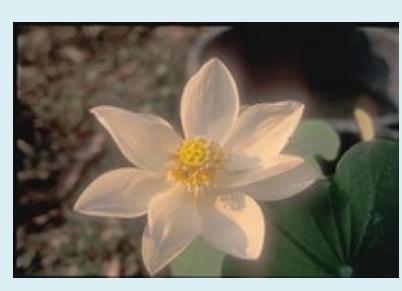
บัวปักกิ่งชมพู



ปุณทริก หรือ บุณทริก



สัตตบุษย์



บัวปักกิ่งขาว

รูปที่ 2.1 สายพันธุ์บัวหลวงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย

บัวหลวงมีลำต้นใต้ดินเป็นแบบเหง้า (rhizome) และไหล (stolon) ลำต้นใต้ดินเมื่อยังอ่อนมีลักษณะกลมเขียว เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่และแก่จะอวบอ้วนเนื่องจากสะสมอาหาร เห็นข้อปล้องได้ชัดเจน ใบและดอกเกิดจากหน่อที่ข้อปล้อง แล้วเจริญขึ้นมาที่ผิวน้ำหรือ ชูพ้นเหนือน้ำ ใบเป็นใบเดี่ยวขนาดใหญ่ ใบกลม แบบ peltate leaf ขอบใบจะเรียบและเป็นคลื่น ทั้งก้านใบและก้านดอกจะมีลักษณะแข็ง มีหนามปกคลุม ด้านในจะมีรูพรุน เมื่อหักจะเป็นสายใยและมีน้ำยางสีขาว ดอกเดี่ยวขนาดใหญ่บานในเวลากลางวัน ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงจำนวน 4-6 กลีบ มีกลีบดอกแตกต่างกันไปตามแต่ละพันธุ์ มีสีขาว สีชมพู สีเหลือง มีเกสรตัวผู้จำนวนมากเป็นสีเหลือง มีทั้งที่เป็นหมันและไม่เป็นหมัน เกสรตัวเมียมีรังไข่แบบ superior ovary ที่มีลักษณะแบบ apocarpous โดยมีส่วนของดอกบวมพองขยายใหญ่หรือเจริญขึ้นมาหุ้มรังไข่แต่ละอันไว้เรียกว่า ฝักบัวจะอยู่เหนือน้ำเมื่อฝักอ่อนจะเป็นรูปกรวยสีเหลืองล้อมรอบด้วยเกสรสีเหลือง เมื่อฝักแก่จะมีรูพรุนลักษณะคล้ายฟองน้ำและมีเมล็ดอยู่ภายใน ซึ่งเมล็ดทั้งอ่อนและแก่สามารถนำมารับประทานได้

2.1 ปัจจัยพื้นฐานในการปลูกบัว

ดินปลูก เป็นดินเหนียว หรือดินร่วนเหนียว มีฤทธิ์เป็นกลางหรือเป็นกรด-ด่างเล็กน้อย ค่า pH ระหว่าง 6.5-8 น้ำมีฤทธิ์เป็นกลาง หรือกรด-ด่างเล็กน้อย เช่นเดียวกับดิน ความลึกของน้ำ ตามพันธุ์และชนิดบัวที่ปลูก ลมค่อนข้างสงบ อุณหภูมิระหว่าง 15-35 องศาเซลเซียส ความลึกของภาชนะปลูกตามลักษณะของชนิดและพันธุ์บัวที่ปลูก มี 4 ระดับคือ ตื้นมาก 7-15 เซนติเมตร ตื้น 16-30 เซนติเมตร ลึกปานกลาง 31-60 เซนติเมตร ลึกมาก 61 เซนติเมตรขึ้นไป ผิวหน้าของน้ำกว้าง 2 เท่าของความลึก (ชมรมผู้รักบัวแห่งประเทศไทย, 2543) ดินปลูกบัวที่เหมาะสมที่สุดต้องมีธาตุโพแทสเซียมค่อนข้างสูง เช่น ดินเหนียว ดินท้องถิ่น ดินท้องไร่ ดินท้องนา ดินท้องร่องสวนขุดใหม่ ไม่ควรใช้ดินที่มีซากอินทรีย์วัตถุที่ย่อยสลายไม่หมด เพราะจะทำให้เน่าเสียได้ การเตรียมดิน นำดินเหนียวที่ได้ตากแดดให้แห้งหุ่ยย่อยให้มีขนาดเล็กลง เก็บเศษวัชพืช ที่ติดมากับดินออกให้หมด แบ่งดินที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปผสมเพื่อทำเป็นดินปลูกอีกส่วนหนึ่งเป็นดินเปล่าๆ ไม่ต้องผสมอะไรทำเป็นดินปิดหน้า (พิพิธภัณฑบัว , 2556) การทำนาบัวสามารถจำแนกตามการใช้ประโยชน์ เช่น เพื่อตัดดอก นิยมปลูกในเขตปริมณฑลรอบกรุงเทพฯ นครปฐม นนทบุรี สุพรรณบุรี เพื่อเก็บเมล็ด นิยมปลูกในจังหวัดอยุธยา อ่างทอง นครสวรรค์ พิจิตร พิษณุโลก และเพื่อเก็บไหล นิยมปลูกในจังหวัดปราจีนบุรี

การขยายพันธุ์ การแยกเหง้า วิธีนี้เหมาะสำหรับบัวในเขตร้อนคือบัวหลวง จะสร้างไหลจากเหง้า (ราก) ของต้นแม่แล้วออกไปเป็นต้นใหม่ สามารถขยายพันธุ์โดยการตัดเหง้า ให้มีความยาวประมาณ 2-3 ข้อ มีตาประมาณ 3 ตา ต้นอ่อนจะขึ้นจากตา และเจริญเป็นต้นใหม่ การเก็บรักษาเหง้าบัว โดยนำมาวางรวมกัน รดน้ำให้โชกปิดด้วยใบตองหรือผ้าที่ชุบน้ำให้เปียก เพื่อรักษาความชื้นอย่าให้แห้ง (พันธุ์บัว 1 เหง้า ควรจะต้องมีตา 3 ตา กรณีที่มีตาไม่ถึง 3 ตา สามารถนำมามัดรวมกันแล้วนับให้ได้ 3 ตา ซึ่งเกษตรกรจะเรียก 1 กำ หรือ 1 จับ)



รูปที่ 2.2 หน้างาบัวหลวงที่ใช้ปลูก

2.2 การปลูกบัว วิธีการปักดำมี 2 วิธีการคือ

1. ใช้ตะเกียบหรือใช้ไม้ค้ำ วิธีการนี้จะใช้ไม้ไผ่เหลาให้หนากว่าตอกเล็กน้อย ยาวประมาณ 50 เซนติเมตรแล้วนำมาพับครึ่ง คีบตรงบริเวณข้อบัวที่เตรียมไว้อย่าให้บัวชำแล้วปักไม้ลงในดินให้ระดับไหลอยู่สูงกว่าระดับผิวดินประมาณ 4 นิ้วเพื่อป้องกันไม่ให้บัวเน่า และเหลือใบให้ลอยน้ำ 1 ใบ

2. ใช้ดินหมก วิธีนี้ใช้กับนาบัวที่สามารถบังคับระดับน้ำได้โดยการปล่อยน้ำออกจากนาบัวซึ่งดินจะอ่อนตัวเหมาะกับการใช้เสียม หรือใช้มือคุ้ยดินให้เป็นหลุมลึก 7-10 เซนติเมตร นำไหลบัวใส่หลุมแล้วนำดินกลบไหลบัวโดยเว้นบริเวณตา หรือบริเวณส่วนยอดไว้เพื่อให้บัวแตกใบ หลังจากปักดำเสร็จ ปล่อยน้ำเข้าให้ท่วมพื้นที่นาบัวหลังจากปักดำแล้ว 15 วัน ถ้าบัวไม่แตกใบใหม่ควรทำการปักดำซ่อม

2.3 การให้น้ำ

ในช่วงเดือนแรกต้องรักษาระดับน้ำให้คงอยู่ในนาบัวประมาณ 30 เซนติเมตร ถ้าระดับน้ำสูงกว่าที่กำหนด ใบบัวที่แตกใหม่ขึ้นมาเหนือผิวน้ำจะโผล่ได้ช้า เป็นสาเหตุให้บัวตาย หลังจากนั้นเมื่อบัวเจริญเติบโตสูงขึ้นปล่อยน้ำเข้าแปลงให้มีความลึกประมาณ 50 เซนติเมตร แต่ไม่ควรเกิน 100 เซนติเมตร เพราะความลึกระดับนี้บัวจะได้รับอุณหภูมิพอเหมาะทำให้บัวสามารถออกดอกได้มาก

2.4 การให้ปุ๋ย

เมื่อบัวเจริญเติบโตและตั้งตัวได้หรือแตกใบใหม่แล้ว ให้เริ่มใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-20-0 หรือ 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ โดยหว่านให้ทั่วแปลง ในกรณีที่มีน้ำไหลตลอดเวลาควบคุมระดับน้ำไม่ได้ให้ใส่ปุ๋ยแบบปุ๋ยลูกกลอน โดยนำปุ๋ยจำนวน 1 ซ้อนกาแฟ บรรจุใส่ดินเหนียวแล้วปั้นดินห่อหุ้มปุ๋ยให้เป็นก้อนกลมแล้วฝังลงให้ห่างนำไปฝังไว้รอบๆโคนต้นบัวประมาณ 2-3 ลูก การใส่ปุ๋ยครั้งต่อไปให้พิจารณาสภาพบัวที่ปลูกอยู่ หากบัวโทรม ดอกบัวมีสีจืด หรือมีขนาดดอกเล็กลง สามารถให้ปุ๋ยได้ การจัดการท่อ หรือปั้นดินหุ้มปุ๋ย โดยให้ฝังท่อปุ๋ย หรือปุ๋ยลูกกลอนหน้าแนวนอนของไหลบัวหลวง โดยฝัง ณ จุดที่ห่างจากปลายเหง้า หรือไหล (คือยอดของต้นบัว) ประมาณ 5-8 เซนติเมตรฝังเฉียง ๆ เข้าไปได้ต้น เมื่อตั้งหลักหลังจากการย้ายปลูกจะเจริญเติบโตแตกหน่อแตกไหลทุกทิศ ถ้าปลูกในภาชนะจำกัดผู้ปลูกจะสังเกตได้ว่าหน่อ หรือไหล หรือเหง้าที่ออกใหม่เจริญเติบโตไปทางไหน จะสามารถเลือกฝังปุ๋ยที่ต้องการ ดังนั้นฝังปุ๋ยเพียง 1-2 จุด ซึ่งจะดูดอาหารจากปุ๋ยไปใช้ได้ทั่วทั้งต้น ปัจจุบันมีปุ๋ยละลายช้า ละลายหมดใน 3 เดือน 6 เดือน คงเหมาะสำหรับผู้ไม่มีเวลาในการดูแลบัวมาก แต่ราคาแพง

การดูแลรักษาบัว คือ ให้อยู่ในที่ที่เหมาะสมที่สุด สภาพที่ดีที่สุด เช่น บัวหลวง เจริญเติบโตตามแนวนอน ภาชนะปลูกจึงควรมี หน้ากว้างมาก ภาชนะปลูกบัวควรบรรจุดินได้ไม่ต่ำกว่า 1 ลูกบาศก์ฟุต หรือเท่ากับประมาณ 1 ปี๊บ ให้อยู่ในที่ที่ปราศจากมลภาวะ ผู้ปลูกต้องคอยตัดใบแก่ที่เริ่มเหลือง และดอกที่เหี่ยวชานแล้วทิ้ง โดยปลิดถึงโคนก้าน ห้ามดึงอย่างเด็ดขาด หากใส่ปุ๋ยมาก บัวกินไม่หมด ปุ๋ยละลายออกมาในน้ำ ใช้น้ำอย่างอื่น ได้แก่ ตะไคร้สำหรับ และจุลินทรีย์เขียว เจริญเร็วกว่าบัว จะกินปุ๋ยหมด การมีศัตรูคอยกินพวกนี้ นอกจากแย่งออกซิเจนในน้ำจากบัวแล้ว เมื่อแก่ตายจะทำให้เน่าเสีย การเปลี่ยนดิน รากแก่ เหง้าแก่ตายเน่าอยู่ในดินทำให้น้ำเสีย เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมเขียว ฯลฯ แก้ไขด้วยการรื้อ เปลี่ยนดินปลูกใหม่ ใช้ปุ๋ยสูตรสมดุล เช่น 15-15-15 หรือ 16-16-16 หนึ่งซีกกาแฟ ห่อกระดาษหนังสือพิมพ์ 1-2 ชั้น อัดใต้โคนต้นบัวลึกสัก 3-4 นิ้ว อย่างน้อย เดือนละครั้ง (เสริมลาภ วสุวัต, 2543)

2.5 การป้องกันกำจัดศัตรูพืชในบัวหลวง

พืชที่จะสามารถส่งออกไปแข่งขันในตลาดการค้าเสรีได้นั้นผลผลิตมีคุณภาพดี สม่าเสมอ และผ่านการรับรองคุณภาพและมาตรฐานในระบบที่เป็นสากล ผลผลิตที่ได้ควรปราศจากการเข้าทำลายของโรคและแมลงศัตรูพืช ตลอดจนปลอดภัยจากสารพิษตกค้างต่างๆ แต่ในสภาพความเป็นจริงผู้ทำน้าบัวมักประสบปัญหาจากการเข้าทำลายโดยแมลงศัตรูพืชมากที่สุด โดยเฉพาะเพลี้ยไฟ (*Frankliniella schultzei* (Trybom), *Selenothrips rubrocinctus* (Giard) และ *Scirtothrips dorsalis* Hood เป็นต้น) หนอนชอนใบ (*Stenochironomus nelambus* Toki & Kur.) และ หนอน บู่ ง กิ น บัว (*Simya conspersa* Moore) (ศิริณี พูนไชยศรี และเพชร เช่งขี้ม, 2536 ; สุวรินทร์ บำรุงสุข และธรรมทิพ ทิพยางค์, 2546) เกษตรกรจึงนิยมแก้ปัญหาโดยใช้วิธีฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดอย่างไม่มีประสิทธิภาพ (การใช้ในปริมาณมาก และใช้สารเคมีที่ไม่ได้รับอนุญาต) ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตแล้ว ยังอาจเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และ

การตกค้างในดอกบัวเกินระดับมาตรฐานการส่งออกด้วย การหาแนวทางการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ และยั่งยืน ทั้งในระหว่างการผลิตและหลังการเก็บเกี่ยวบัวหลวงจึงเป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจากการส่งออกผลผลิตไปต่างประเทศจะต้องมีการสุ่มตรวจแมลงศัตรูพืช หากพบศัตรูพืชที่มีชีวิตผลผลิตจะถูกทำลายทันที (กรมวิชาการ เกษตร, 2555)

2.6 การบังคับและควบคุมการออกดอกบัวหลวง

โดยปกติ การออกดอกของบัว (flowering) เกิดขึ้นหลังปลูกเลี้ยง 3 เดือน และทยอยเก็บเกี่ยวดอก ได้อีกนาน 4 เดือน ก่อนที่จะเข้าสู่การพักตัว (dormancy) ในช่วงฤดูหนาว พร้อมกับลดปริมาณดอก และการเหี่ยวของใบแก่ที่ชูพ้นน้ำ เกษตรกรจำเป็นต้องบังคับให้เหง้าแตกยอดใหม่ ด้วยการไถกลบและทุบไหลที่อยู่ใต้ดิน จนกว่าบัวจะให้ผลผลิตดอกชุดใหม่ในอีก 3 เดือนถัดไป ช่วงเวลาดังกล่าว จึงทำให้บัวมีผลผลิตออกสู่ตลาดน้อยลง และเป็นผลให้ดอกบัวมีราคาสูงขึ้น (ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย, 2549)

2.7 การเก็บดอก

บัวจะเริ่มให้ผลผลิตดอกตูมหลังจากปลูก 3 เดือน โดยทั่วไปเกษตรกรเก็บดอกวันเว้นวัน ยกเว้นในฤดูหนาว เก็บวันเว้น 2 วัน การเก็บดอกจะเก็บในระยะที่ดอกยังตูม โดยตัดให้มีก้านดอกยาว 40-50 เซนติเมตร คัดขนาดแล้วนำมาจัดเป็นกำ กำ ละ 10 ดอก การจัดต้องจัดเรียงให้เห็นดอกทั้ง 10 ดอก หลังจากนั้นจึงห่อด้วยใบบัว หลังจากเก็บเกี่ยวดอกเป็นเวลา 3-4 เดือน ต้นบัวจะเริ่มโทรมผลผลิตลดลง เกษตรกรมีวิธีบังคับให้ไหลแตกต้นใหม่ โดยระบายน้ำออกจากนาให้แห้ง แล้วใช้รถแทรกเตอร์ลงไปไถดะเพื่อลดความหนาแน่นของต้นบัว หรืออาจใช้ลูกขลุ่ยทุบ แล้วปล่อยน้ำเข้าอีกครั้ง บัวจะเริ่มแตกยอดใหม่ และสามารถเริ่มเก็บดอกได้ในเวลา 2-3 เดือน

2.8 การเก็บเกี่ยวฝักแก่

เมื่อปลูกบัวได้ประมาณ 3-4 เดือน ก็จะเริ่มเก็บฝักได้ ฝักแก่จะสังเกตได้จากฝักปลายเมล็ดเริ่มแห้งเป็นสีเทา หรือสีดำ หากปล่อยให้แห้งทั้งฝักเมล็ดจะหลุดจากขั้วร่วงง่าย ระยะเวลาตั้งแต่ดอกตูมถึงเก็บฝักได้ประมาณ 40-50 วัน บัวจะให้ผลผลิตนาน 3-4 เดือน จากนั้นจะเริ่มโทรม ในการเก็บฝักบัวนั้นจะใช้เรือล่อเข้าไปแปลงบัว แล้วใช้ไม้สอยฝักบัวใส่เรือ ไม้ที่ใช้สอยนี้ชาวบ้านเรียกว่า"ชาว" ซึ่งยาวประมาณ 3 วา เมื่อเก็บฝักได้เต็มลำเรือแล้วขนขึ้นมาเก็บรวมกันในลานดิน แล้วใช้ไม้ทุบให้ฝักฉีกเมล็ดแก่จะร่วงหลุดออกจากฝัก ถ้ายังมีเมล็ดบัวติดค้างในฝักอีกจะใช้คนแกะออกมาเมล็ดที่ได้จะนำไปตากแดดให้แห้งประมาณ 2-3 แดด จากนั้นเอาตะแกรงร่อนเอาเมล็ดลีบหรือเมล็ดเสียออกแล้วบรรจุเมล็ดบัวที่ดีลงกระสอบเตรียมส่งขายต่อไป ผลผลิตเมล็ดบัวแห้งจะได้ไร่ละประมาณ 12-15 ถัง หรือประมาณ 144-180 กิโลกรัม ราคาที่เกษตรกรขายได้ถังละ 120-400 บาท การดูแลรักษาหลังจากเก็บฝักหลังจากเก็บฝักบัวแล้วประมาณ 3 เดือน ต้นจะเริ่มโทรมให้ระบายน้ำออกจากแปลงบัวให้แห้ง เมื่อดินแห้งพอที่จะใช้รถไถลงไถได้ ให้ไถดะพลิกหน้าดินให้ลึกเพื่อที่จะทำให้ดินโปร่งขึ้น รากบัวชั้นบนๆ ซึ่งเป็นรากขนาดเล็กลดจำนวนลง ถ้าหากไม่มีการไถในปีต่อมา บัวจะขึ้นแน่นมากทำให้ฝักบัวมีขนาดเล็กมาก เมื่อไถแล้วปล่อยน้ำเข้าทันทีเพื่อป้องกันไม่ให้หญ้าขึ้น ต้นบัวใหม่จะงอกขึ้นมาพ้นน้ำในเวลาประมาณ 3-7 วัน ถ้าจะทำ การขุดไหลเพื่อ

จำหน่าย เมื่อบัวเริ่มโถมใช้ปุ๋ยเคมีบำรุงให้บัวแตกใบใหม่ มีไหลขนาดใหญ่และแข็งแรงเมื่อบัวงามดีแล้วจึงระบายน้ำออกให้แห้งจนดินแตกกระแวง ใช้เสียมจัดตามระแวงที่ดินแตกออกเป็นก้อนๆ เมื่อพบไหลขุดมาจำหน่ายได้ ซึ่งจะตรงกับระยะประมาณเดือน มกราคม-กุมภาพันธ์ ไหลที่ขุดได้ ถ้าจะเก็บรักษาไว้เพื่อรอการปลูกหลังจากเก็บขึ้นมาแล้วให้นำมากองไว้แล้วรดน้ำให้โชก แล้วใช้ใบตองปิดไว้และพยายามรดน้ำบ่อยๆ อย่าให้ไหลแห้งจะสามารถเก็บไหลไว้ได้ประมาณ 1 เดือน

บัวหลวงมีข้อจำกัดเรื่องการสูญเสียคุณภาพของดอกเร็ว เนื่องจากจากบัวหลวงเป็นพันธุ์ไม้ที่มีน้ำยาง จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของดอกเร็วกว่าดอกไม้ชนิดอื่นๆ เช่น การเกิดตำหนิสีดำ การร่วงโรยของกลีบดอกเร็วกว่าดอกไม้ชนิดอื่นๆ และ การปฏิบัติภายหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสม กลีบดอกบัวหลวงเกิดการซ้ำ ได้ง่ายมาก รอยซ้ำ ของกลีบดอกจะเป็นสีดำเนื่องจากเซลล์สะสมน้ำยางถูกทำลาย ทำให้น้ำยางไหลออกมาสัมผัสกับอากาศและเกิดเป็นสีดำ รวมทั้งกลีบรอบนอกสุดสีจะซีด และร่วงโรยได้ง่าย การทำให้ดอกบัวมีคุณภาพดีและยืดอายุการปักแจกันได้นานจะทำให้ดอกบัวหลวงมีคุณภาพดี มีความสวยงาม และเป็นที่ยอมรับของตลาด การฉีดสารเคลือบผิวก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว สามารถลดการคายน้ำและการสูญเสียน้ำทำให้เซลล์ไม่ซ้ำ และการผลิตเอทิลีนน้อยลงตลอดจนพื้นที่การเกิดตำหนิน้อยลงด้วย (ชุมพล มากทอง และภูมิพัฒน์ ศิริพลานนท์, 2552)

2.9 การตลาด

ตลาดดอกบัวที่สำคัญ คือ ปากคลองตลาด และตลาดจำหน่ายดอกไม้ในทุกจังหวัด โดยมีราคาแต่ละช่วงของปีไม่เท่ากัน ดอกบัวมีราคาดีในช่วงเดือนธันวาคม - กุมภาพันธ์ และราคาต่ำในช่วงเมษายน-ตุลาคม แต่ราคาเฉลี่ยประมาณดอกละ 1 บาท นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีการส่งดอกบัวไปจำหน่ายในต่างประเทศประเทศผู้รับซื้อที่สำคัญ คือ ออสเตรเลีย เยอรมนี สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น (ทวีพงศ์ สุวรรณโร, ม.ป.ป.) ในประเทศไทยนิยมซื้อขายเมล็ดบัวแห้งที่ยังไม่ได้กะเทาะเปลือก เพราะสามารถเก็บไว้ได้นาน เมื่อถึงช่วงที่ตลาดต้องการจึงกะเทาะออกมาจำหน่าย สำหรับตลาดรับซื้อเมล็ดบัวภายในประเทศที่สำคัญ คือ ตลาดทรงวาด และตลาดคลองเตย นอกจากนี้ยังสามารถส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศโดยประเทศที่รับซื้อที่สำคัญคือ เกาหลีใต้ สหรัฐอเมริกา และสิงคโปร์

2.10 ประโยชน์ของบัว

ไทยมีพื้นที่การผลิตบัวหลวงประมาณ 1,500 ไร่ กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ แบ่งเป็นสัดส่วนการผลิต คือ แถบภาคกลาง บริเวณกรุงเทพฯ และปริมณฑลเน้นการผลิตเพื่อตัดดอก แถบอยุธยา อ่างทอง และนครสวรรค์ เน้นการผลิตเพื่อเก็บเมล็ด ตัดดอก และเกสรตากแห้ง ขณะที่จังหวัดปราจีนบุรีปลูกเพื่อเก็บเกี่ยวไหล (อรรพรรณ วิชัยลักษณ์ และภุริพันธุ์ สุวรรณเมฆ, ม.ป.ป.) บัวหลวงเป็นบัวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด และเกษตรกรปลูกมากที่สุด โดยมีวัตถุประสงค์ของการปลูกที่สำคัญ 2 ประการ คือ ปลูกเพื่อตัดดอกตูม ซึ่งนำไปใช้บูชาพระ และปลูกเพื่อเก็บเมล็ด ซึ่งสามารถใช้ประกอบอาหารทั้งอาหารคาวและอาหารหวานนอกจากนี้ส่วนอื่นๆ ของบัวหลวงยังสามารถจำหน่ายและใช้ประโยชน์อื่นๆ ได้ เช่น ใบแห้ง ใช้ทำยาแก้นิ่ว มวนบุหรี ต้มเป็นยาไทยบำรุงหัวใจ แก้ไข้ และรักษาโรคตับ ใบสดใช้ห่ออาหาร และไหลหรือรากสามารถนำมา

เชื่อมเป็นอาหารหวาน มีสรรพคุณแก้ร้อนใน และระงับอาการท้องร่วง

“บัว” เป็นผักพื้นบ้าน สามารถนำส่วนต่างๆ ของบัวมาปรุงเป็นอาหารอาทิ อาหารคาวที่มีการนำเหง้า ไหลบัว หรือรากบัว กลีบดอกและก้านบัวมาใช้เป็นผักจิ้ม หรือนำมาผัด ต้มหรือแกง ใบบัวอ่อนนำมาปรุงเป็นอาหารเช่น แกงจืดไก่ใบบัวอ่อน สุกียากี้ไก่ใบบัวอ่อน นำใบอ่อนมาใช้เป็นผักจิ้ม หรือนำใบมาอบแห้งชงดื่มแทนน้ำชาแก้ร้อนในกระหายน้ำได้เป็นอย่างดี (เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล, 2551 : 57) เมล็ดบัวสามารถตากแห้งนำมาปรุงอาหารได้ทั้งคาวและหวาน เช่น เมล็ดบัวฉาบน้ำตาล เมล็ดบัวเชื่อม เมล็ดบัวกวนทำไส้ขนม และยังสามารถทำเครื่องดื่ม อาทิ น้ำรากบัวปั่น น้ำเมล็ดบัวปั่น เกสรบัวสามารถใช้เข้าเครื่องยาไทยและจีน โดยเฉพาะยาลม ยาหอม ยาขับปัสสาวะ ปัจจุบันนี้คนสนใจเรื่องสุขภาพกันมากขึ้น สรรพคุณของบัวหลวงมีประโยชน์ในด้านสมุนไพร เมล็ดบัวช่วยบำรุงกำลัง แก้กษัย ท้องร่วง สมานแผล แก้ร้อนใน เจริญอาหาร ช่วยให้กระชุ่มกระชวย ผักบัว ช่วยขับลม สมานแผล และแก้พิษเบื่อเมา ก้านบัว รักษาโรคลมออกหู และแก้ท้องเดิน เหง้าบัว แก้ท้องเสีย แก้พิษ ฝี ปวดบวม รักษาแผลไฟลวก ช่วยขับปัสสาวะ บำรุงกำลัง แก้ร้อนใน กระหายน้ำ ใบบัว บำรุงร่างกาย แก้ไข้ แก้ปวดฝี ปวดศีรษะ และช่วยห้ามเลือด ดอกบัวแก้ท้องเสีย อาเจียน แก้ไข้ บำรุงหัวใจ แก้จุกเสียด เกสร บำรุงกำลัง บำรุงตับ แก้ไข้มีพิษ ขับเสมหะ แก้ท้องร่วง ขับปัสสาวะ ดีบัว ช่วยขยายหลอดเลือด แก้กระหาย (เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล, 2551 : 58) กลิ่นหอมจากน้ำมันหอมระเหยของพืชสมุนไพร ซึ่งช่วยบำบัดอาการผิดปกติต่างๆ ได้ เนื่องจากกลิ่นจะช่วยกระตุ้นให้สารร่างกายหลังสารเอ็นโดฟิน ที่ช่วยลดความเจ็บปวด สารเอนเซปฟาไลน์ที่ทำให้มีอารมณ์ดี และสารเซโรโทนิน ที่ช่วยให้ร่างกายรู้สึกสงบเยือกเย็นและผ่อนคลายได้ และเนื่องจากน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส บางชนิด มีฤทธิ์เป็นยากระตุ้นหรือเป็นยานอนหลับ กลิ่นหอมจึงถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งรูปแบบการใช้กลิ่นหอมเช่นนี้เองที่คนสมัยนี้นิยามว่าเป็น “อโรมาเทอราปี” (Aromatherapy) หรือ สุคนธ์บำบัด การนำกลิ่นหอมมาบำบัดรักษา เป็นการแพทย์ทางเลือก (Alternative Medicine) เช่น สหรัฐอเมริกายอมรับวิธีการบำบัดรักษาคนไข้ด้วยกลิ่นเป็นวิธีรักษารูปแบบหนึ่ง

2.11 หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือที่เรียกอีกชื่อว่า In Vitro enzymatic gene amplification อาศัยหลักการเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) โดยทำให้เกิดในหลอดทดลองแบบซ้ำกันหลายๆ รอบ ซึ่งจะมี 3 ขั้นตอนในแต่ละรอบดังนี้

1. การแยกดีเอ็นเอต้นแบบ (denaturation) ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็น ดีเอ็นเอเส้นคู่จะถูกแยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 94-96 องศาเซลเซียส นาน 30-60 วินาที ขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ คือในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์เฮลิเคส (helicase) ช่วยในการแยกสารและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

2. การจับคู่ของไพรเมอร์ (primer annealing) ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณที่เป็นลำดับเบสคู่สม ที่อุณหภูมิประมาณ 50-65 องศาเซลเซียส นาน 30-60 วินาที ในสิ่งมีชีวิตมีเอนไซม์ที่มีชื่อว่า ไพรเมส (primase) เป็นตัวสร้างอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ขึ้น

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายไพรเมอร์ (DNA synthesis or primer extension) ขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมเบสที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ที่ เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30-120 วินาที เวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอขึ้นกับความยาวของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยทั่วไปใช้เวลา 1 นาที สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอยาว 1 กิโลเบส แต่ถ้าดีเอ็นเอที่ต้องการมีขนาดน้อยกว่า 500 คู่เบสให้ใช้เวลา 30 วินาที

เมื่อปฏิกิริยาดำเนินครบทั้ง 3 ขั้นตอน เรียก 1 รอบพีซีอาร์ (PCR cycle) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมดังกล่าวเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ เครื่องนี้สามารถกำหนดจำนวนรอบ และสามารถเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิให้สูง และต่ำได้รวดเร็วอย่างอัตโนมัติ หลังปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบแรกโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมาย 1 คู่ จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า คือ 2 คู่ ต่อมาในรอบที่สองดีเอ็นเอเส้นคู่ 2 ชุดแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว 4 เส้น เพื่อทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และจะได้ดีเอ็นเอชุดใหม่ 4 ชุด เมื่อถึงรอบที่สามจะได้ดีเอ็นเอชุดใหม่จำนวน 8 คู่ ผลผลิตดีเอ็นเอจึงเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณแบบ “exponential amplification” ซึ่งได้เท่ากับ 2^n เมื่อ n คือจำนวนที่ทำปฏิกิริยา ถ้าจำนวนรอบในการทำพีซีอาร์มากขึ้น โอกาสที่จะได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ผิดพลาดมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลง และมีพื้นหลัง (background) มากขึ้น แต่ถ้าใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ก็น้อยลง โดยทั่วไปนิยมใช้ประมาณ 20-40 รอบ

2.12 องค์ประกอบสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยทั่วไปนิยมใช้ในช่วง 10-50 นาโนกรัม ในแต่ละปฏิกิริยา
2. ไพรเมอร์ (primers) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเริ่มต้นขนาดสั้นๆ สองสายมักมีความยาวสายละ 18-25 เบส ซึ่งได้จากการสังเคราะห์ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายหนึ่งเรียกว่า forward primer หรือ upper primer อีกสายหนึ่งเรียกว่า reverse primer หรือ lower primer แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (complementary) กับลำดับเบสด้านปลาย 3' ของสายดีเอ็นเอแม่แบบแต่ละสาย คู่ไพรเมอร์นี้จะจับที่ตำแหน่งที่อยู่ขอบข้าง (flanking region) กับดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มจำนวน
3. ดิออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ซึ่งมี 4 ชนิดได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP
4. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส
5. สารละลายบัฟเฟอร์ ช่วยให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ดำเนินไปได้ดีในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม
6. น้ำกลั่น (dH_2O) ที่ปราศจากเชื้อ ใช้ปรับปริมาตรในปฏิกิริยาพีซีอาร์
7. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอสายใหม่ นิยมใช้เอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำพุ ชื่อ (Thermusaquaticus) จึง เรียกเอนไซม์นี้ว่า Taq DNA polymerase เอนไซม์นี้จึงมีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 95 องศาเซลเซียส แต่ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้เพียงที่ 72 องศาเซลเซียส

2.13 เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซมซึ่งสามารถบ่งบอกตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบได้ และมีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ ซึ่งยังเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในด้านต่างๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้นำเอาเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องบ่งชี้ลักษณะทางด้านการเกษตร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกให้สูงขึ้น ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นตัวบ่งชี้ทางสรีรวิทยาที่ปรากฏโดยทั่วไปสามารถสังเกตได้ เช่น ความสูงของต้น ลักษณะสีดอก ลักษณะความแตกต่างของใบ เป็นต้น เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดนี้จัดว่าเป็นเครื่องหมายที่มีความต้องการมากในวงการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะถ้าเป็นเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ผลผลิตสูงหรือต้านทานต่อโรคแมลง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ และข้อได้เปรียบของเครื่องหมายชนิดนี้ คือไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการใดมาตรวจสอบ เพราะสามารถมองเห็นได้ด้วยตาอยู่แล้ว หากแต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดมากเช่นกัน เนื่องจากมีอยู่จำนวนจำกัด และที่สำคัญการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยามักได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่น ความสูงผลผลิตหรือสีดอก

2. เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical marker) คือการใช้โมเลกุลทางชีวเคมีเป็นตัวระบุความแตกต่างของพืชที่ทำการศึกษา เช่น การใช้ไอโซไซม์ (isozyme) หรือโปรตีนในการศึกษาพืชในประชากรหรือพืชต่างชนิด แต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดที่การแสดงออกของเอนไซม์ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป และระยะการเจริญเติบโตของพืชเช่นเดียวกับเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา

3. เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) คือการใช้ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างระดับยีน (gene) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น การปรับปรุงพันธุ์ในระดับโมเลกุล (molecular breeding) เป็นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ติดตามลักษณะที่สนใจในระดับยีน ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อลดขั้นตอนในการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) หรือเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการผสมกลับ (marker assisted backcross, MAB) ซึ่งวิธีการนี้ให้ผลอย่างเด่นชัดในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ ประกอบกับปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุ์พืชที่เป็นประโยชน์ใหม่ๆ ได้อย่างรวดเร็ว (สมวงศ์ ตระกูลรุ่ง, 2543) ในอดีตนักปรับปรุงพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะทำการศึกษาลักษณะภายนอกที่ปรากฏหรือแสดงออกมาให้เห็น (phenotype) และการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมซึ่งยังไม่มีการศึกษาทางด้านชีววิทยาโมเลกุล แต่ในปัจจุบันความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลมีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว และมีบทบาทในสาขาวิชาต่างๆ มากมาย เช่น การใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพ และพันธุวิศวกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์กรรมพืชและสัตว์ และในการพัฒนาอุตสาหกรรมบางประเภทหรือใช้ในการตรวจวินิจฉัย และรักษาโรคในการแพทย์ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) โดยมีการวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ (DNA) เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชชนิดใดชนิดหนึ่งจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ทำให้การวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วเนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีเท่ากันในทุกๆ เซลล์ จึงสามารถศึกษาได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม

ไม่ขึ้นกับระยะเวลาการเจริญเติบโตและอวัยวะใด เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดแรกที่น่าสนใจ คือ RFLP (restriction fragment length polymorphism) โดยมีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด เมื่อมีการพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งทำได้รวดเร็วและง่าย ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ๆ ในการวิเคราะห์โดยอาศัยการใช้พีซีอาร์เป็นหลัก ข้อดีคือใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น แรงงานน้อย ค่าใช้จ่ายต่ำและแปลผลง่าย เครื่องหมายดีเอ็นเอได้รับการพัฒนามาจากเทคนิคพีซีอาร์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่มีไพรเมอร์ (primer) ชนิดจำเพาะเจาะจง (specific primer) เครื่องหมายชนิดนี้ ได้แก่ STS (sequence-tagged site) และ SSR (simple sequence repeat) และประเภทที่มีไพรเมอร์ไม่จำเพาะเจาะจง (random primer) ได้แก่ RAPD (random amplified polymorphic DNAs) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism) นอกจากนี้พืชแต่ละชนิดสามารถให้แบบแผนของแถบดีเอ็นเอ หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง จึงถือว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม ที่สามารถตรวจสอบได้ในพืชแต่ละชนิด ข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทำให้สามารถติดตามการถ่ายทอดของลักษณะนั้นๆ ไปยังรุ่นต่อไปได้ เรียกว่าเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุ์พืชได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโต ในกรณีที่เมล็ดพันธุ์มีจำนวนจำกัดยังสามารถช่วยย่นระยะเวลา และค่าใช้จ่ายด้านการดูแลพืช (จุลภาค คูนวงศ์, 2543)

2.14 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอฟดี (RAPD)

โมเลกุลเครื่องหมายแบบอาร์เอฟดี เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่ม หรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า พีซีอาร์ (PCR) (Welsh และ McClelland, 1990, Williams et al., 1990) พืชแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวโดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม หรือ “arbitrary primer” เครื่องหมายอาร์เอฟดีถูกนำมาใช้งานปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อนสามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ การระบุเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอฟดี จำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพราะดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชนั้นมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอจึงต้องอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วจะมีการแยกตัวของเส้นดีเอ็นเอมากที่สุด และการตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอบนอากาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ โดยการย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ และจำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยการให้ค่าตามการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยให้ค่าเป็น 1 สำหรับการปรากฏแถบดีเอ็นเอและให้ค่าเป็น 0 สำหรับการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

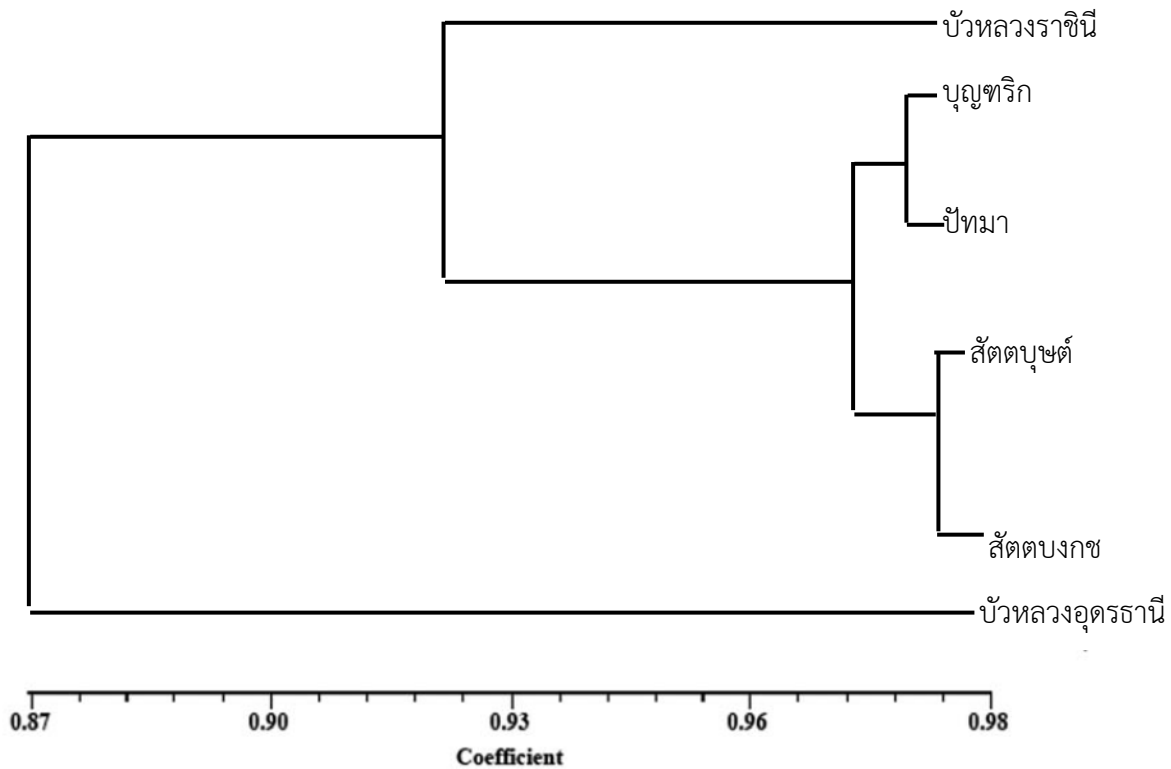
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจัยที่จะช่วยทำให้การพัฒนาบัวเพื่อใช้เป็นพืชเศรษฐกิจใหม่ของไทยประสบความสำเร็จได้จำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือจากทุกภาคส่วนเป็นสำคัญ ทั้งการพัฒนาสายพันธุ์ เทคโนโลยีการผลิต การเกษตรกรรม การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว มาตรฐาน กฎระเบียบข้อบังคับ การตลาดและการวางแผน ตลอดจนการพัฒนาแนวทางการใช้ประโยชน์บัวหลวงที่หลากหลาย โดยเกษตรกร นักวิชาการ นักวิจัย ผู้ส่งออก ผู้ใช้งาน และภาครัฐ เพื่อผลักดันศักยภาพของดอกบัวหลวงสู่ตลาดอาเซียนจนสามารถขยายสู่ตลาดเอเชียและก้าวสู่ตลาดโลก (ภาณุพล หงส์ภักดี, 2556) กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการสำรวจและรวบรวมพันธุ์บัวจาก 33 จังหวัดทั่วประเทศ สามารถคัดเลือกบัวหลวงพันธุ์ดีจำนวน 109 สายพันธุ์ และปลูกรวบรวมไว้ตามสถานีทดลองต่างๆ ซึ่งคาดว่าจะได้ใช้ประโยชน์เพื่อพัฒนาพันธุ์ต่อไป (จินตน์กานต์ งามสุทธา, 2555)

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาพันธุกรรมของพืชและสัตว์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากการเป็นเครื่องมือที่ศึกษาถึงกลไกในระดับโมเลกุลที่ควบคุมให้เกิดลักษณะต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายชนิด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) ทั้งที่เป็น dominant markers ได้แก่ RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) นฤมล ธนानันต์ รุจิเรข นพเกสร และธีระชัย ธนานันต์ (2554) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ติเนีย 9 พันธุ์ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 59 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกพุดทั้ง 9 พันธุ์ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าสามารถจำแนกพุดสกุลการ์ติเนียได้เป็น 4 กลุ่ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.81 วลัยลักษณ์ หัตถบุรณ์ และเจษฎา เด่นดวงบริพันธ์ (2554) ได้ศึกษาเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ และการระบุเพศของสละหม้อจากจังหวัดจันทบุรีพืชสกุลระกำ (Salacca) จัดเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในจังหวัดจันทบุรี โดยเก็บตัวอย่างพันธุ์ระกำมี 3 พันธุ์ โดยเริ่มจากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ทั้ง 3 พันธุ์ ผลการวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 187 ไพรเมอร์ พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำ ซึ่งในจำนวน 5 ไพรเมอร์ นี้พบว่ามีเพียง 1 ไพรเมอร์ (NAPS062) ที่แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ และให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 410 คู่เบส ที่มีความจำเพาะต่อสละหม้อเพศเมียเท่านั้น

ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์ (2543) ได้ศึกษาเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อการจำแนกพันธุ์พริกในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างพริก 14 พันธุ์ มาตรวจสอบกับไพรเมอร์ จำนวน 72 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ 70 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และนำมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของพริก พบว่าสามารถแยกความ

แตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ สามารถแบ่งบัวหลวงเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ บัวหลวงพระราชินี บุญทริก ปัทมา สัตตบุษย์ และสัตตบงกช มีค่าดัชนีความเหมือน 0.91-0.98 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะกลีบดอก กลุ่มที่ 2 ได้แก่ บัวหลวงอุดรธานี ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1 มีค่าดัชนีความเหมือน 0.86-0.89 (นฤมล ธนानันต์ และมานะ ขาวเมฆ, 2549)



รูปที่ 2.3 การแบ่งกลุ่มบัวหลวงที่มีค่าดัชนีความเหมือนและสอดคล้องกับลักษณะกลีบดอก

บัวหลวงปทุมจากเพชรบุรี (บัวหลวงพระราชินี) เป็นบัวที่สมเด็จพระบรมราชินีนาถทรงโปรดให้อนุรักษ์ไว้ เพราะมีต้นสูงใหญ่ ดอกใหญ่ ฝักใหญ่ และรังไข่มาก เป็นบัวที่มีลักษณะดีและสามารถนำไปใช้ประโยชน์อีกมาก ต้องอนุรักษ์ไว้และมีการปรับปรุงพันธุ์และวิธีการผลิตให้มีคุณภาพผลผลิตต่อไป (ชลีพร เตชะศีลพิทักษ์, ม.ป.ป.)

2.16 น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (volatile oils หรือ essential oils หรือ ethereal oils) มีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีกลิ่นระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีสี แต่เมื่อทิ้งไว้นานๆ อาจถูกออกซิไดส์ (oxidised) ให้สีเข้มขึ้น สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง ตามชนิดของพืชเช่นพืชตระกูลขิง-ข่าพบที่เหง้าหรือหัว พืชตระกูลส้มพบที่ใบและผิวเปลือกผล วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยมีหลายวิธี (ประเทืองศรี สิ้นชัยศรี, 2547; อรชร เอกภาพสากล, 2547) ดังนี้

2.16.1 การกลั่น (distillation) โดยอาศัยน้ำร้อนเป็นตัวพาน้ำมันหอมระเหยออกจากส่วนของพืชจากนั้นจึงสกัดน้ำมันหอมระเหยออกจากน้ำด้วยการใช้กรวยแยก เหมาะสำหรับพืชที่ไม่สลายตัวง่ายเมื่อให้ความร้อนเช่น พืชตระกูลขิง-ข่า แบ่งออกเป็น 3 วิธีย่อยคือการกลั่นด้วยน้ำร้อน การกลั่นด้วยไอน้ำและการกลั่น

ด้วยน้ำและไอน้ำ องค์ประกอบของชุดกลั่นประกอบด้วย หม้อกลั่น เครื่องควบแน่น

2.16.1.1 การกลั่นด้วยน้ำร้อน (hydro-distillation) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการกลั่นน้ำมันหอมระเหยโดยนำพืชจุ่มลงในน้ำร้อนแล้วให้ความร้อนน้ำจะพาน้ำมันหอมระเหยออกจากส่วนของพืชที่เหมาะสมสำหรับพืชที่ทนความร้อนได้สูงเช่นขิง ไพล ขมิ้น

2.16.1.2 การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) วิธีนี้อาศัยไอน้ำเป็นตัวพาน้ำมันหอมระเหยออกจากพืชโดยพืชไม่ได้แช่อยู่ในน้ำร้อนโดยตรง แต่ต้องรอให้ไอน้ำร้อนผ่านไปยังพืช

2.16.1.3 การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) การกลั่นวิธีนี้ใช้ตะแกรงใส่พืชเหนือระดับน้ำในหม้อต้มน้ำเดือด นิยมใช้วิธีนี้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหยทางการค้า

2.16.2 การสกัดด้วยไยเย็น (enfleurage) โดยใช้ไขมันเป็นตัวดูดซับกลิ่นของน้ำมันหอมระเหยจากพืช แล้วจึงสกัดกลิ่นออกจากไขมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น การสกัดด้วยไยแพะเช่นการสกัดกลิ่นมะลิ (วิภา พลันสังเกตุ และสโรชา ชื่นกิจ, 2552)

2.16.3 การสกัดด้วยไยร้อน (maceration) ไยที่นำมาสกัดต้องสกัดและไม่มีกลิ่นเหมือนกับวิธีการสกัดด้วยไขมันเย็น แต่วิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดพืชที่มีกลิ่นหอมแต่เมื่อเด็ดจากต้นจะหมดกลิ่นทันที ดังนั้นเมื่อสกัดด้วยไยร้อนจะสกัดกลิ่นได้มากกว่าการสกัดด้วยไยเย็น โดยการอุ่นไยที่ 80 องศาเซลเซียส และเติมพืชที่ต้องการสกัดน้ำมันหอมระเหยและแช่ไว้อีกประมาณ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงสกัดกลิ่นออกจากไขมัน

2.16.4 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์นิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยออกได้ง่ายเช่นอีเทอร์ รองลงมาเบนซีน วิธีนี้นิยมใช้สำหรับการสกัดดอกไม้สดและการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ สิ่งที่ได้เรียกว่า oleoresin หรือน้ำมันชัน

2.16.5 การสกัดโดยการบีบหรืออัด วิธีนี้เหมาะสำหรับพืชที่มีต่อน้ำมันหอมระเหยมากเช่นผิวส้ม ผิวมะกรูด ใช้เครื่องมือที่เรียกว่า screw press เจาะที่ต่อน้ำมันหอมระเหยพร้อมกับการอัด น้ำมันที่ได้เรียกว่าน้ำมันดิบ

2.16.6 การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤติ (supercritical carbon dioxide extraction) เป็นวิธีที่ใหม่และได้ผลดีและช่วยลดมลพิษในอากาศได้ด้วย เนื่องจากทำสภาวะเหนือจุดวิกฤติ แก๊สนี้เป็นของไหล จึงสกัดน้ำมันหอมระเหยออกจากพืชได้ดี และสามารถแยกน้ำมันหอมระเหยที่ได้ออกจากแก๊สนี้ได้ที่อุณหภูมิห้อง

น้ำมันหอมระเหยจำแนกตามชนิดขององค์ประกอบน้ำมันหอม (รัตนิน อินทรานูปกรณ์, 2553) ดังนี้

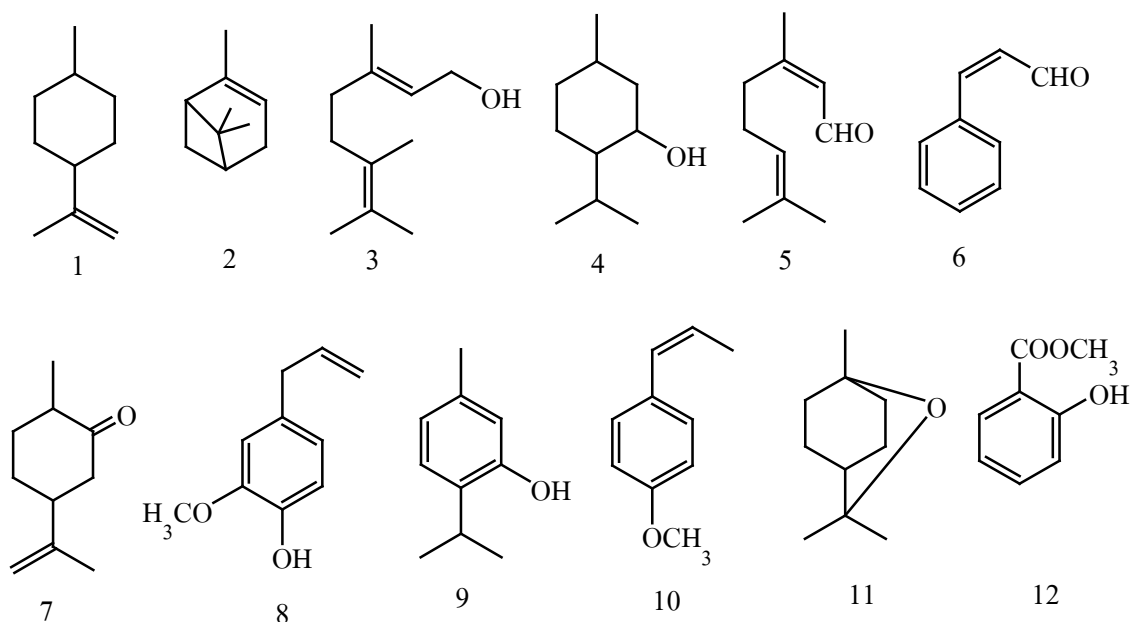
1. น้ำมันหอมระเหยที่มีสารไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก (hydrocarbon volatile oils) เช่น ลิโมนีน (limonene) รูปที่ 2.4 (1) พบในเมล็ดส้มและไพนีน (pinene) รูปที่ 2.4 (2) พบในน้ำมันสน (turpentine oil) และในน้ำมันไพล

2. น้ำมันหอมระเหยที่มีสารแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก (alcohol volatile oils) เช่น จีรานีออล (geraniol) รูปที่ 2.4 (3) พบในน้ำมันดอกกุหลาบและเมนทอล (menthol) รูปที่ 2.4 (4) ในน้ำมันสะระแหน่

3. น้ำมันหอมระเหยที่มีสารแอลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบหลัก (aldehyde volatile oils) เช่น ซิโตรเนลลาล (citronellal) รูปที่ 2.4 (5) ในน้ำมันตะไคร้หอม และซินนามาลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) รูปที่ 2.4 (6) ในน้ำมันอบเชย (cinnamon oil)

4. น้ำมันหอมระเหยที่มีสารคีโตนเป็นองค์ประกอบหลัก (ketone volatile oils) เช่น คาร์วอน (carvone) รูปที่ 2.4 (7) ในน้ำมันเทียนตากบ

5. น้ำมันหอมระเหยที่มีสารฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก (phenol volatile oils) เช่น ยูจีนอล (eugenol) รูปที่ 2.4 (8) ในน้ำมันกานพลูและไทมอล (thymol) รูปที่ 2.4 (9) ในไทม์
6. น้ำมันหอมระเหยที่มีสารฟีนอลิกอีเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (phenolic ether volatile oils) เช่น อะนิโทล (anethole) รูปที่ 2.4 (10) ในน้ำมันจันทน์แปดกลีบหรือน้ำมันโปยักและในน้ำมันเทียนข้าวเปลือก
7. น้ำมันหอมระเหยที่มีสารออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก (oxide volatile oils) เช่น ยูคาลิปตอล (eucalyptol) รูปที่ 2.4 (11) ในน้ำมันยูคาลิปตัส และในน้ำมันเสม็ดขาว
8. น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (ester volatile oils) เช่น เมทิลซาลิไซเลต (methyl salicylate) รูปที่ 2.4 (12) ในน้ำมันระกำ



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างสารเคมีหลักในน้ำมันหอมระเหย

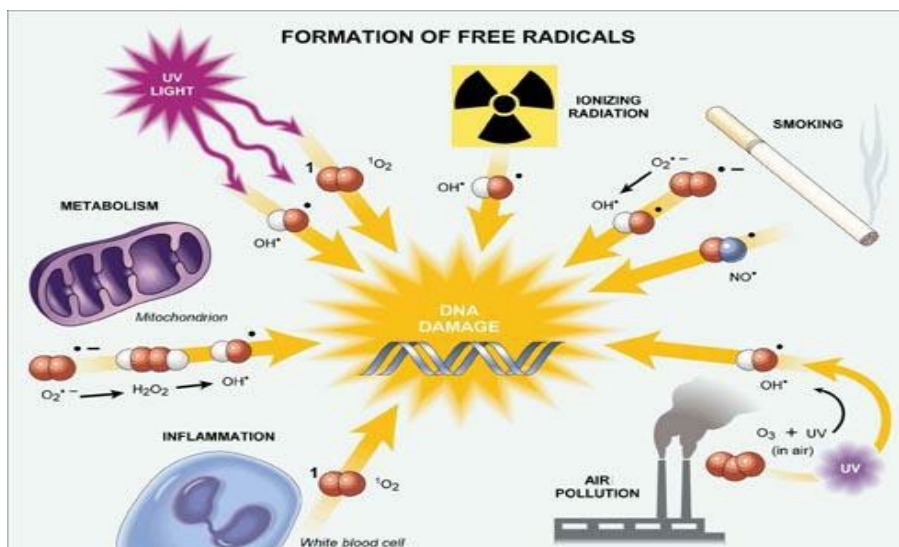
พืชสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยและนำมารักษาโรค เช่น น้ำมันกานพลู (clove oil) จากดอกกานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) ในวงศ์เมอ์ทาซีอี (Myrtaceae) ใช้บรรเทาอาการปวดฟันมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ น้ำมันไพลจากเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) ในวงศ์ขิงขมิ้น (Zingiberaceae) มีฤทธิ์ลดการอักเสบ ฟกช้ำแก้เคล็ดขัดยอก (สมภพ ประธานธรรักษ์และพร้อมจิต ศรีลัมพ์, 2547)

2.17 ปฏิริยาออกซิเดชัน

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งมีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (outer orbital) มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีสูงโดยจะดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้เกิดความเสถียรทำให้โมเลกุลที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ แล้วทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไปเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ (โอภา วัชรคุปต์, 2550) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเป็นโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งมีอิเล็กตรอน (ประจุลบ) อย่างน้อยหนึ่งตัว และมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ หรือโมเลกุลอื่นที่มีประจุบวกอยู่รอบๆ ได้ดี สามารถส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ที่มีอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยา และนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ได้ง่ายขึ้น

2.18 แหล่งการเกิดอนุมูลอิสระ

แหล่งการเกิดอนุมูลอิสระมาจากทั้งภายในร่างกาย เช่นมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมเซลล์ทั่วไป กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย กระบวนการทำลายเชื้อโรค ส่วนแหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระที่เกิดภายนอกในร่างกายเช่น รังสียูวีในแสงแดด คาร์บอนไฟเบอร์และการเผาไหม้และมลพิษจากโรงงาน (รูปที่ 2.5) (ไมตรี สุทธิจิตต์ และวรพล เองวานิช, 2555)

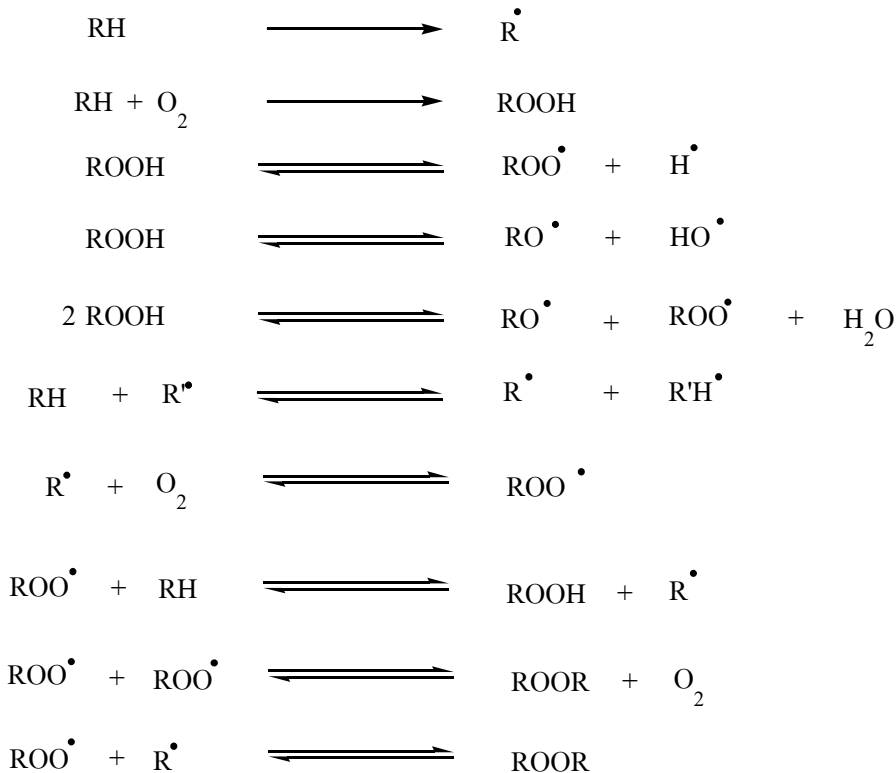


รูปที่ 2.5 แหล่งการเกิดอนุมูลอิสระ

ที่มา : ไมตรี สุทธิจิตต์ และวรพล เองวานิช (2555)

2.19 ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical chain reaction) แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเรียกว่าขั้นตอนอินิทิเอชัน (initiation step) เป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ขั้นที่สองเรียกว่าขั้นพรอพาเกชัน (propagation step) เป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่น และขั้นสุดท้ายเรียกว่าขั้นเทอร์มิเนชัน (termination step) เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูลได้เป็นสารที่มีความเสถียร (Hudson, 1990) ดังกลไกปฏิกิริยาดังในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 กลไกปฏิกิริยาการเกิดลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

2.10 สารต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือ สารต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถป้องกันหรือยืดระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาให้เกิดได้ช้าลงซึ่งในการแบ่งกลุ่มของสารต้านออกซิเดชัน (เสาวนีย์ จักรพิทักษ์, 2542) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ

2.10.1 สารต้านออกซิเดชันจากกระบวนการสร้างของร่างกายเมื่อแบ่งสารต้านออกซิเดชันตามกระบวนการสร้างของร่างกายสามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือสารต้านออกซิเดชันที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นเองได้ กับที่ไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้นเช่นเอนไซม์ต่างๆวิตามิน แร่ธาตุ และ สารอาหารในพืช สารต้านออกซิเดชันเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งอนุมูลอิสระที่เกิดจากปัจจัยภายในและภายนอกร่างกาย แต่

สารต้านออกซิเดชันที่พบในพืชแต่ละชนิดนั้นก็จะมีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการที่จะได้รับสารต้านออกซิเดชันในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย จึงจำเป็นต้องบริโภคผักผลไม้ที่แตกต่างกัน

2.10.2 สารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาติแต่ถ้าแบ่งสารต้านออกซิเดชันตามที่พบในธรรมชาติสามารถแบ่งออกได้ 4 ประเภท ดังนี้

2.10.2.1 สารต้านออกซิเดชันที่ร่างกายสร้างขึ้นแบ่งออกเป็น 2 ประเภทด้วยกัน คือ เอนไซม์และสารเคมีอื่นๆในร่างกายเช่น กลูตาไธโอน

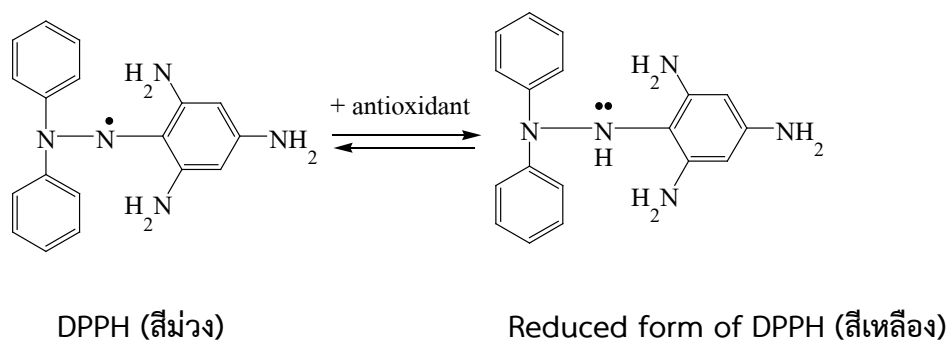
2.10.2.2 วิตามิน วิตามินหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี วิตามินเอ

2.10.2.3 แร่ธาตุแร่ธาตุที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น แมกนีเซียม ซีลีเนียม

2.10.2.4 สารพฤษเคมีในพืช สารสำคัญในพืชมีอยู่มากมายหลายชนิดที่มีส่วนช่วยในการเป็นสารต้านออกซิเดชันซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดทุติยภูมิเช่นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เบต้าแคโรทีน (β -carotene) ไลโคพีน (licopene)

2.11 อนุมูลอิสระ DPPH

อนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radicalหรือ DPPH $^{\bullet}$) มีคุณสมบัติที่โดดเด่นคือเป็นอนุมูลอิสระชนิด Organic nitrogen radical ที่มีความคงตัวและสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV-Vis ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH $^{\bullet}$ เกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือได้รับอิเล็กตรอนจะมีการเปลี่ยนสีคือสีม่วงเข้มของ DPPH $^{\bullet}$ จะจางลงเป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 2.7 ซึ่งการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นนี้สามารถติดตามวัดได้ด้วยเครื่องมือ Spectrophotometer (ไมตรี สุทธิจิตต์ และวรพล เองวานิช, 2555)



รูปที่ 2.7 สมการการเกิดออกซิเดชันของ DPPH

จากการศึกษางานวิจัยในบัวหลวงพบว่ามีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (ตารางที่ 2.1) ที่น่าสนใจดังนี้

ตารางที่ 2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับบัวหลวง

ผลการวิจัย	เอกสารอ้างอิง
น้ำมันหอมระเหยจากใบจากตัวอย่างบัวหลวงที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 9 ชนิด และจากธรรมชาติ 2 ชนิด ที่กลั่นด้วยไอน้ำ มีปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์ และโปรแอนโธไซยานิน ที่แตกต่างกัน และแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ ABTs scavenging assay ด้วยค่า IC_{50} ในช่วง 10.25 ± 0.49 - 21.06 ± 0.59 $\mu\text{g/ml}$ และ 104.95 ± 2.12 - 268.98 ± 0.392 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โดยมี BHT เป็นสารมาตรฐาน	Zheng et al., 2012
สารสกัดชั้นน้ำของดอก ใบ เมล็ด ราก ลำต้น แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ค่า IC_{50} = 5, 29, 5, 150, 162 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โดยมีวิตามินซี และ BHT เป็นสารมาตรฐาน และพบว่าสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารให้ความขาวและสารต้านริ้วรอยด้วยวิธี adenosine inhibition และ elastase inhibition ตามลำดับ	Kim et al., 2011
สารสกัด 50% เอทานอลในน้ำของดอกบัวหลวงขาวและดอกบัวหลวง แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus subtilis</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ด้วยค่าขอบเขตการยับยั้ง (nm) ในช่วง 9-16 และ 8-14 ตามลำดับ โดยมียา chloramphenicol เป็นสารมาตรฐาน	Venkatesh and Dorai, 2011
การศึกษากลุ่มประกอบในสารหอมระเหยเกสรบัวหลวงที่สกัดด้วยเอทานอลพบสารหลายกลุ่มได้แก่ Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester และ 9, 12, 15 - Octadecatrienoic acid, methyl ester และสารสกัดที่ได้จากเกสรบัวหลวงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ค่า IC_{50} = 20.42 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีวิตามินซี ค่า IC_{50} = 15.14 $\mu\text{g/ml}$	วิภา พลันสังเกตุ และสโรชา ชูนิกิจ, 2552

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากเกสรบัวหลวงด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและการสกัดด้วยไซแพะซึ่งเป็นวิธีการของ วิภา พลันสังเกตุ และสโรชา ชูนิกิจ (2552) ที่ใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกมะลิโดยใช้ไซแพะ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยมีทั้งหมด 4 กิจกรรมด้วยกันได้แก่

1. การสำรวจเก็บและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินีในจังหวัดเพชรบุรี
2. การใช้วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์บัวหลวงราชินี
3. ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงราชินี
4. การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวราชินีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3.1 การสำรวจเก็บและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินีในจังหวัดเพชรบุรี

การดำเนินการวิจัย โครงการเก็บและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินีได้ประสานงานกับหน่วยงานท้องถิ่น ที่ดูแลพื้นที่ที่มีบัวหลวงราชินี สถานที่ดำเนินงานทดลองเป็นแหล่งเชื้อพันธุ์ทั้งหมด 8 แหล่งในจังหวัดเพชรบุรี โดยเก็บข้อมูลการพัฒนาของบัวหลวงราชินีจากแหล่งปลูกธรรมชาติ ตั้งแต่ ใบ ดอก ฝัก และเมล็ด ทำการวิจัย เพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์พันธุ์บัวหลวงราชินี เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและต่อยอดงานวิจัย บัวหลวงราชินี สามารถพัฒนา หรือฟื้นฟูแหล่งกำเนิดบัวหลวงสายพันธุ์ดังกล่าวให้มีความหนาแน่นมากขึ้น และ เป็นการสนองพระราชประสงค์ของสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถในการอนุรักษ์บัวหลวงสายพันธุ์นี้ให้ คงอยู่ตลอดไป โดยได้ดำเนินการสำรวจเก็บข้อมูลสายพันธุ์บัวหลวงราชินีเพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวง ราชินีที่มีในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี (รูปที่ 3.1) มีทั้งหมด 8 แหล่งด้วยกัน ได้แก่

ตำแหน่งที่พบ GPS : พิกัดที่ 47P05982651422393 คลองชลประทานหน้าวัดหนองเฒ่าถ่าน ตำบล ดอนขุนห้วย ตำบลชะอำ อำเภอชะอำ

ตำแหน่งที่พบ GPS : พิกัดที่ 47P05964861449262 บ้านเหมืองหาม หมู่ที่ 4 ตำบลลาดโพธิ์ อำเภอ บ้านลาด

ตำแหน่งที่พบ GPS : พิกัดที่ 47P05986021426979 คลองชลประทาน ตำบลท่าคอย อำเภอท่ายาน

ตำแหน่งที่พบ GPS : พิกัดที่ 47P05878991451385 คลองชลประทานหมู่ที่ 2 ตำบลห้วยท่าช้าง อำเภอเขาย้อย

ตำแหน่งที่พบ GPS : พิกัดที่ 47P06043041444460 คลองชลประทานบ้านใหม่หมู่ที่ 4 ตำบล โปไร่หวาน อำเภอเมืองเพชรบุรี

ตำแหน่งที่พบ GPS : พิกัดที่ 47P05792821439229 บึงบัวของรีสอร์ททิวาชา ชัมบาล่า หรือ มูลนิธิ วิทยาศาสตร์ทางจิตเพื่อการพัฒนา อำเภอหนองหญ้าปล้อง

ตำแหน่งที่พบ GPS : พิกัดที่ 47P06047211453078 คลองชลประทานหมู่ที่ 2 ตำบลท่าแร้งออก อำเภอบ้านแหลม

ตำแหน่งที่พบ GPS : พิกัดที่ 47P05688761427929 บึงบัวใต้เขื่อนแก่งกระจาน อำเภอแก่งกระจาน



วัดหนองเฒ่าถ่าน ต. ดอนขุนห้วย อ. ชะอำ



คลองชลประทาน หมู่ที่ 2 ต.ห้วยท่าช้าง อ.เขาย้อย



บ้านเหมืองหมาม หมู่ที่ 4 ต. ลาดโพธิ์ อ.บ้านลาด



คลองชลประทานหมู่ที่ 4 ต. โพไร่หวาน อ. เมืองเพชรบุรี



คลองชลประทาน ต. ท่าคอย อ. ท่ายาง



บึงบัวของรีสอร์ททิวาชา ชัมบาล่า อำเภอหนองหญ้าปล้อง



คลองชลประทานหมู่ที่ 2 ตำบลท่าแร้งออก อำเภอบ้านแหลม



บึงบัวใต้เขื่อนแก่งกระจาน อำเภอแก่งกระจาน

รูปที่ 3.1 แหล่งที่สำรวจเก็บข้อมูลและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี

3.2 การใช้วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์บัวหลวงราชินี

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์ ได้แก่ วงบ่อซีเมนต์ ดินเหนียว ดินเหนียวปลูกไม้น้ำ มูลโค และปุ๋ยเม็ด(ปุ๋ยบัว)

3.2.2 วิธีดำเนินการทดลอง โดยทำการปลูกบัวหลวงราชินี ลงในวงบ่อซีเมนต์ ซึ่งมีวัสดุปลูกที่ใช้คือ 1) ดินเหนียวตามธรรมชาติ คือ ดินนาทั่วไป 2) ดินเหนียว (ที่ใช้ปลูกไม้น้ำทั่วไป) และ 3) ดินผสม (ดินเหนียว : มูลโค ; 7 : 1) คือ ดินเหนียวที่ใช้ปลูกไม้น้ำทั่วไปผสมกับมูลโคคลุกเคล้าให้เข้ากัน ทำการทดลองตั้งแต่เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ณ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ซึ่งวางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) ในวัสดุปลูก 3 ชนิด หรือ 3 สิ่งทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 วงบ่อ ทำการบันทึกข้อมูล ด้านความสูง ขนาดใบ (ความกว้างและความยาวของใบ) จำนวนใบ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ซึ่งวัสดุปลูกทั้ง 3 ชนิดได้ดำเนินการวิเคราะห์ดินปลูก และทดลองปลูกในวงบ่อซีเมนต์

3.3 ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงราชินี

3.3.1 อุปกรณ์และสารเคมี อุปกรณ์ สารเคมีและการเตรียมสารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก

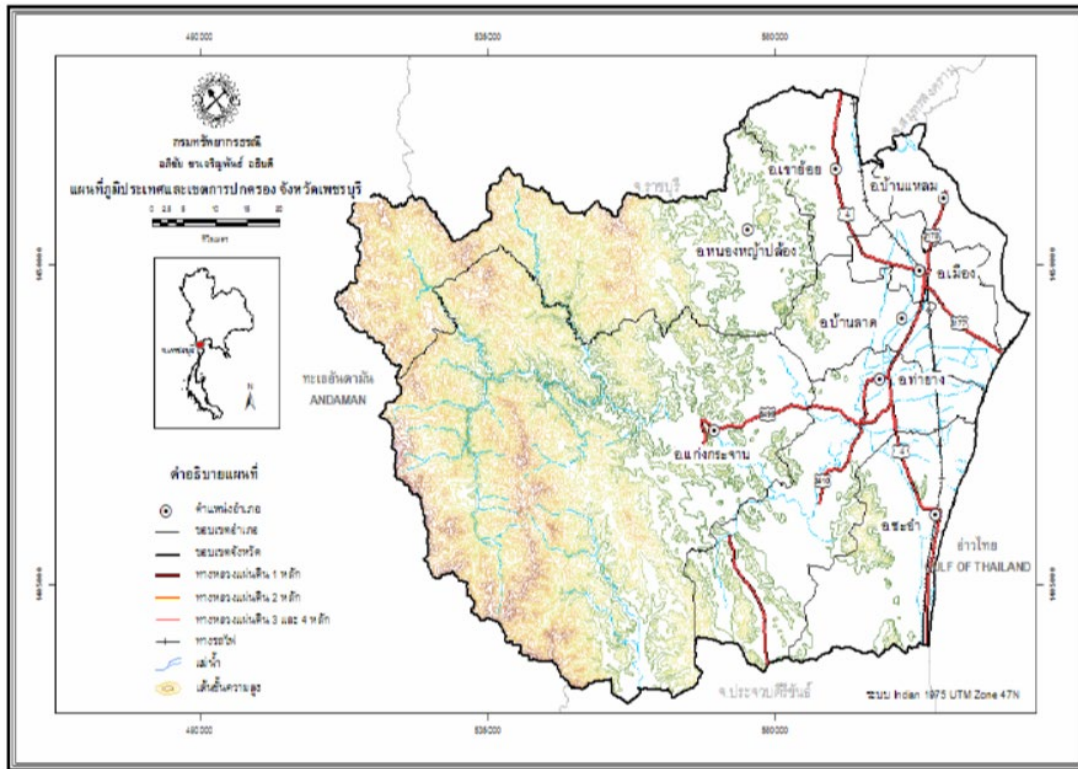
3.3.2 วิธีดำเนินการทดลอง สถานที่ในการเก็บตัวอย่างบัวในจังหวัดเพชรบุรีจำนวน 8 แห่ง ได้แก่ อำเภอบ้านลาด อำเภอชะอำ อำเภอท่ายาง อำเภอเมือง อำเภอเขาย้อย อำเภอบ้านแหลม อำเภอแก่งกระจาน และอำเภอหนองหญ้าปล้อง โดยเก็บตัวอย่าง อำเภอละ 2 ตัวอย่าง และสายพันธุ์แท้จำนวน 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 19 ตัวอย่าง

ที่ตั้งและอาณาเขตจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรีตั้งอยู่ในภาคตะวันตกของประเทศไทย โดยห่างจากกรุงเทพมหานครไปทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ ทางรถยนต์สายธนบุรี - ปากท่อ ประมาณ 120 กิโลเมตร มีเนื้อที่ทั้งสิ้น 6,225.138 ตารางกิโลเมตร หรือเท่ากับ 3,890,771.2 ไร่

ลักษณะภูมิประเทศ พื้นที่ส่วนใหญ่ของจังหวัดเพชรบุรีเป็นที่ราบสูง มีภูเขาและป่าไม้ ทางทิศตะวันออกเป็นที่ราบลุ่มไปจนจรดอ่าวไทย เป็นที่ประกอบกิจการเกษตรได้เป็นอย่างดี ทางทิศตะวันตกเป็นที่ราบสูงและเทือกเขาตะนาวศรี ซึ่งกั้นพรมแดนระหว่างไทย และประเทศเมียนมาร์ (สาธารณรัฐสังคมนิยมแห่งประเทศไทย) นอกจากนี้ยังมีป่าไม้อยู่ในท้องที่อำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอบ้านลาด อำเภอท่ายาง อำเภอชะอำ และอำเภอแก่งกระจาน แสดงในรูปที่ 3.2

ลักษณะภูมิอากาศ จังหวัดเพชรบุรีเป็นจังหวัดชายทะเล จึงมีอากาศอบอุ่นสบายไม่ร้อนจัดและไม่หนาวจัด ในปี 2539 อุณหภูมิสูงสุด 37.3 องศาเซลเซียส ต่ำสุด 14.6 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปี 27.7 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนจากสถานีอุตุนิยมวิทยาตั้งแต่ปี 2530-2539 มีฝนตกประมาณปีละ 100 วัน

จำนวนน้ำฝนประมาณ 955.1 มิลลิเมตรต่อปี และมีฝนตกมากที่สุดในเดือนกันยายน - ตุลาคม ในปี 2539
 นับว่าฝนตกมากกว่าเกณฑ์เฉลี่ยโดยมีฝนตก 127 วัน วัดปริมาณน้ำฝนได้จำนวน 1,136.9 มิลลิเมตร



รูปที่ 3.2 แผนที่จังหวัดพังงา

ที่มา : กรมทรัพยากรธรณี (2551)

3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอบัวหลวง เตรียมใบบัวหลวง 19 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างใบบัวหลวงในเขต จังหวัดพังงาเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1987) ดังนี้ นำตัวอย่างใบอ่อน ของใบบัวหลวงมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งบดให้ละเอียดด้วย 2X CTAB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง เทตัวอย่างใส่หลอดทดลองขนาดปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยพลิกหลอดทุกๆ 10 นาที เติมนสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol ให้เต็มหลอด ผสม สารละลายให้เข้ากันดีโดยพลิกกลับหลอดไปมา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เตรียมหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตรแล้วดูดสารละลายที่แขวนลอยอยู่ชั้นบนมาใส่หลอดทดลองที่เติมน isopropanol ไว้ พลิกหลอด ไปมาเบาๆ นำเข้าตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 2 รอบเทของเหลวทิ้งแล้วตากหลอดทิ้งไว้ 20 นาที เติมน 75% ethanol + 10mM ammonium acetate ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที

แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 2 รอบ เทของเหลวทิ้งแล้วตากไว้ เป็นเวลา 20 นาที เติม 75% ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วตากทิ้งไว้ข้ามคืนให้ดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าดีเอ็นเอจะละลายหมดเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.4 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เตรียมอากาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ผสมดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับ TE dye ปริมาตร 9 ไมโครลิตร หยดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมกับ TE dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอากาโรสเจล พร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 500, 300 และ 100 นาโนกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ใช้แถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue ที่มีใน TE dye เป็น ตัวสังเกต ให้เคลื่อนตัวห่างจากช่องหยดตัวอย่างประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นนำอากาโรสเจลมาแช่ในภาชนะที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาที บันทึกภาพถ่ายภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อเปรียบเทียบความชัดเจนของแถบ และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มีความเหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยใช้น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.3.5 การปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เตรียมอากาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ผสมดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ TE dye ปริมาตร 8 ไมโครลิตร หยดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมกับ TE dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอากาโรสเจล พร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 14, 12 และ 10 นาโนกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 20 นาที ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ใช้แถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue ที่มีใน TE dye เป็นตัวสังเกต จากนั้นนำอากาโรสเจลมาแช่ในภาชนะที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้แถบชัดเจนขึ้น แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น บันทึกภาพถ่ายภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตแถบที่เหมาะสมควรมีความหนาใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ถ้าหากดีเอ็นเอมีความหนากว่าแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ควรปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นจนกว่าจะได้แถบดีเอ็นเอที่มีความหนาใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 ปฏิกริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) องค์ประกอบในการปฏิกริยาพีซีอาร์ โดยการเตรียมสารละลายในหลอดทดลองปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร (5 นาโนกรัม/ ไมโครลิตร) 10x PCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 2 mM primer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 4 mM dNTPs ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 50mM MgCl₂ ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร 5 unit Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.16 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 5.24 ไมโครลิตร ปฏิกริยาพีซีอาร์ระยะ pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ในระยะ denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที ระยะ annealing ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 45 รอบ ระยะ extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 วินาที และระยะสิ้นสุดใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

3.3.7 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกริยาพีซีอาร์ การเตรียมอากาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ ใช้เวลา 60 นาที นำแผ่นเจลอากาโรสไปแช่ในสารละลายที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ ไว้ 30 นาที แช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาที บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องบันทึกภาพ Gel Documentation รุ่น Gene Flash

3.3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล ตรวจสอบตำแหน่งของการปรากฏแถบดีเอ็นเอ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยพิจารณาแถบหลักที่มีความชัดเจน (major band) เท่านั้น ซึ่งบันทึกผลจะใช้ระบบตัวเลข คือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็นเลข 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เป็นเลข 0 โดยทำการบันทึกทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.01d โดยใช้ Jaccard coefficient คำนวณหาค่าความเหมือนทางพันธุกรรม แล้วสร้างเดนโดรแกรมโดย UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) เพื่อจัดกลุ่มบัว

3.4 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวราชินีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3.4.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงราชินี
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวราชินี

3.4.2 ขอบเขตของการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี เก็บบัวหลวง ที่วัดเขาบันไดอิฐ ต.ไร่ส้ม อ.เมือง จ. เพชรบุรี เดือน มิถุนายนถึงกรกฎาคม 2558 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยและสารหอมระเหยที่สกัดได้ด้วยวิธี GC-MS ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.3 วิธีการทดลอง สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต

สารเคมี	เกรดหรือความบริสุทธิ์	บริษัทผู้ผลิต
Ascorbic acid	Analytical	APS
Absolute Methanol	Analytical	MERCK
anhydrous sodium carbonate	Analytical	Ajax Finechem
Ethanol	Analytical	MERCK
DPPH	Analytical	Sigma-ALDRICH

3.4.4 เครื่องมืออุปกรณ์ ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต

เครื่องมือ	บริษัท
MassHunter GC/MS Acquisition	Agilent Technologies, Inc.
เครื่องUV-Visible spectrophotometer รุ่น UV-1601	Shimadzu, Australia
เครื่อง Vacuum Rotary Evaporator	
- Rotavapor รุ่น R – 124	Buchi
- Vacuum รุ่น B -169	Buchi
- cooling รุ่น RTE -111	Buchi
- Heater รุ่น B –480	Buchi
เครื่อง Hotplate	Becthai Bangkok Equipment & Chemical
Heating and Shaker water bath	Becthai Bangkok Equipment & Chemical
UV Lamp	
เครื่องแก้ว	-
ปิเปตต์	-
กระดาษกรอง	Whatman

3.4.5 ตอนที่ 1 การสกัดน้ำมันหอมระเหย ในการวิจัยครั้งนี้ สกัดน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวง 3 วิธี โดยมีวิธีการสกัด ดังนี้

3.4.5.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำตัวอย่างเกสรบัวหลวงสดและแห้งแยกออกเป็น 2 ส่วนเพื่อแช่หมักด้วยเอทานอลเป็นเวลา 3 วัน 3 ครั้งกรองสารละลายเอทานอล ออกจากกากเกสรบัวหลวงและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องจะได้ น้ำมันหอมระเหย นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนและคำนวณร้อยละน้ำหนักน้ำมันหอมระเหยเกสรสด

3.4.5.2 การสกัดด้วยไซแพะ

วิธีเตรียมไซแพะ ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยไซแพะ แบ่งเป็น 2 วิธี คือ การสกัดด้วยไซเย็น และการสกัดด้วยไซร้อน โดยขั้นตอนเตรียมไซแพะสะอาด ดังนี้

ทำความสะอาดไขมันแพะ และกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการออก จากนั้นหั่นไขมันเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาซึ่งใส่ในขวดแก้วปากกว้าง เติมไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนของไขมัน: ไดคลอโรมีเทน 1:2 (w/v) ปิดฝาให้แน่นแล้วตั้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 วันแยกเอาชั้นไดคลอโรมีเทนใส่ในขวดปากกว้าง วางไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 2 วัน เพื่อระเหย ไดคลอโรมีเทนออกจนหมด ขูดไขมันเก็บไว้ในขวดที่สะอาด แล้วเติมเอทานอลลงไป ในอัตราส่วน 1:1 (w/v) ปิดฝาให้สนิท ตั้งไว้เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปใช้ในการสกัดด้วย 2 วิธี (วิภา พลันสังเกต และสโรชา ชื่นกิจ, 2552) ดังต่อไปนี้

3.4.5.2.1 การสกัดโดยใช้ไซแพะด้วยไซเย็น แยกไซแพะที่แช่อยู่ในเอทานอล ออกแล้วอุ่นไซในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนไซละลายนำไซที่ได้มาเทลงบนจานอาหาร (petri dish) จำนวน 14 คู่ เกลี่ยไซสัณฐานให้ทั่วแผ่น ปลอ่ยให้แห้งและแข็งตัว วางเกสรบัวหลวง 1 ดอกบนไซที่ฉาบอยู่บนจานอาหาร 1 คู่ โดยไม่ให้เกสรบัวขี้ วางไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิห้อง เปลี่ยนเกสรบัวใหม่ทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน และขูดไซออก ที่มีน้ำมันหอมระเหยออกมาแช่ในตัวทำละลายเอทานอล 1 คืน แล้วระเหยเอทานอลให้แห้ง ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาร้อยละของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้

3.4.5.2.2 การสกัดด้วยไซร้อน อุ่นไซในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนละลายหมดใส่เกสรบัวหลวงสดลงไป แล้วคนเบาๆ 1 ชั่วโมงและวางไว้ อีก 1 ชั่วโมง แล้วกรองแยกกากออก นำไซที่มีน้ำมันหอมระเหยแช่ในตัวทำละลายเอทานอล 1 คืน นำเอทานอลมาระเหยแห้ง ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาร้อยละของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้

3.4.6 ตอนที่ 2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่อง GC-MS

เตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 10% ในเมทานอล

เตรียมใช้เครื่อง HP 5890 Gas Chromatograph – HP 5972 Mass Selective Detector ตรวจวัด และใช้สภาวะการทดสอบดังนี้ Inlet temperature : 240°C, He carrier flow 1.0 mL/min, split mode Oven initial temperature : 60°C 2 นาที, Ramp to 250°C 10 minutes at 10°C / นาที, Column : HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox, 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m, Ionization mode : Electron, Ionization Acquisition mode : Scan, 30-500 amu, Solvent delay time : 2.0 minutes, Transfer line temperature : 280°C

3.4.7 ตอนที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี DPPH

3.4.7.1 เตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 5000 500 50 5 0.5 และ 0.05 μ g/mL ในเมทานอล

3.4.7.2 เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์โดยชั่ง DPPH ประมาณ 0.008 กรัม ละลายในเมทานอลแล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.4.7.3 ปิเปตต์สารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติม เมทานอล 3.7 มิลลิลิตร

3.4.7.4 ปิเปตต์สารละลายน้ำมันหอมระเหย 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ทำ 3 ซ้ำ) เขย่า หลอดทดลองบ่มในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV) ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยมีชุดควบคุมที่ปราศจากน้ำมันหอมระเหยและชุดตัวอย่างที่มีน้ำมันหอมระเหยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน วิตามินซี

3.4.7.5 หาค่า IC_{50} เมื่อน้ำมันหอมระเหยนั้นแสดงค่าร้อยละการต้านออกซิเดชัน ≥ 50 ที่ ความเข้มข้นเริ่มต้น 125 μ g/mL

การคำนวณหาปริมาณ %inhibition

$$\%inhibition = \frac{A \text{ control} - A \text{ sample}}{A \text{ control}} \times 100$$

A sample = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

A control = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม

4.3 กิจกรรมที่ 3 การจำแนกบัวหลวงในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรีด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ดำเนินการเก็บตัวอย่างใบบัวหลวงกลุ่มบัวหลวงปทุมในพื้นที่ต่างๆของจังหวัดเพชรบุรี ทั้งหมด 8 อำเภอ จำนวน 16 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างบัวหลวงในกลุ่ม บัวหลวงสัตตบงกช บัวหลวงปทุมทริกและ บัวหลวงสัตตบุษย์ จำนวน 3 ตัวอย่าง แยกแหล่งที่เก็บตัวอย่างได้ ดังตารางที่ 4.8 และตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 แหล่งที่มาของตัวอย่างบัวหลวงกลุ่มปทุม

อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
บ้านลาด แหล่ง 1	1	ป้อม ปตท บ้านลาด ต. สมอพลี
บ้านลาด แหล่ง 2	1	บ้านตำหุ ต. ตำหุ
ชะอำ แหล่ง 1	1	บ้านหนองเฒ่าถ่าน ต.นายาง
ชะอำ แหล่ง 2	1	ชุมชนบ้านใหญ่ ต. ชะอำ
ท่ายาง แหล่ง 1	1	บ้านคลองสาย 1 ต. ท่ายาง
ท่ายาง แหล่ง 2	1	บ้านหนองบัว ต. หนองจอก
เมือง แหล่ง 1	1	บ้านหนองไม้เหลียง ต. ดอนยาง
เมือง แหล่ง 2	1	บ้านช่องสะแก ต. ช่องสะแก
เขาย้อย แหล่ง 1	1	บ้านหนองส้ม ต. สระพัง
เขาย้อย แหล่ง 2	1	บ้านหนองชุมพล ต. หนองชุมพล
บ้านแหลม แหล่ง 1	1	บ้านทุ่งเพ็ญ ต. บางครก
บ้านแหลม แหล่ง 2	1	บ้านนาบัว ต. บางแก้ว
แก่งกระจานแหล่ง 1	1	ใต้เขื่อนแก่งกระจาน ต. แก่งกระจาน
แก่งกระจานแหล่ง 2	1	บ้านห้วยกวางจริง ต. พุสวรรณ
หนองหญ้าปล้อง แหล่ง 1	1	บ้านยางน้ำกลัดเหนือ ต. ยางน้ำกลัดเหนือ
หนองหญ้าปล้อง แหล่ง 2	1	บ้านหนองหญ้าปล้อง ต. หนองหญ้าปล้อง

ตารางที่ 4.9 แหล่งที่มาของตัวอย่างบัวหลวงกลุ่มอื่นๆ

กลุ่มบัวหลวง	จำนวนตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
บัวหลวงสัตตบงกช	1	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ต. นาวิ่ง อ. เมือง จ. เพชรบุรี
บัวหลวงปทุมทริก	1	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ต. นาวิ่ง อ. เมือง จ. เพชรบุรี
บัวหลวงสัตตบุษย์	1	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ต. นาวิ่ง อ. เมือง จ. เพชรบุรี

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอและการประเมินความเข้มข้นดีเอ็นเอ

ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอบัวหลวงตามวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1987) จำนวน 46 ตัวอย่าง พบว่าประสบความสำเร็จ สามารถสกัดดีเอ็นเอได้การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

บนอากาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบแถบดีเอ็นเอ ปรากฏทั้งหมด ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจะมีระดับความหนา และความคมชัดต่างกัน สามารถประเมินความเข้มข้นดีเอ็นเอบั่วหลวง จำนวน 11 ตัวอย่าง อยู่ในช่วงระหว่างความเข้มข้น 80 ถึง 220 นาโนกรัม / ไมโครลิตร การปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอ 5 นาโนกรัม / ไมโครลิตร

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอบั่วหลวง จำนวน 46 ตัวอย่าง มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงระหว่างความเข้มข้น 80 ถึง 220 นาโนกรัม / ไมโครลิตร ซึ่งยังไม่เหมาะต่อการเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จึงต้องปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอบั่วหลวง จำนวน 11 ตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นที่ 5 นาโนกรัม / ไมโครลิตร ทุกตัวอย่าง

4.3.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี (RAPD) และปฏิกิริยาพีซีอาร์

เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดีสามารถค้นพบยีนในสภาพข่ม (dominance) สามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมที่เป็นการข่มของยีนภายในตำแหน่งเดียวกัน (homozygous recessive) และทำได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นพืช ตั้งแต่ระยะเป็นเมล็ด ต้นอ่อน จนถึงระยะสุกแก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดีนี้ใช้ปริมาณชิ้นส่วนพืชหรือใบ สำหรับดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่ง ไพรเมอร์มีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์

การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1. pre denature โดยการใช้อุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที

ขั้นตอนที่ 2. denature โดยการใช้อุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที เป็นการทำให้ DNA template แยกเป็นสายเดี่ยว

ขั้นตอนที่ 3. annealing ด้วยอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ต้องใช้อุณหภูมิค่อนข้างต่ำเพื่อให้ primer ไปเกาะตรงบริเวณคู่สมกันให้มากที่สุด และเกิดการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

ขั้นตอนที่ 4. extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำให้เอนไซม์ DNA polymerase นำ nucleotide ที่เป็นคู่สมกับ DNA template มาต่อกับ primer จนเป็นเส้นยาว

ขั้นตอนที่ 5. final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

การทดสอบทำปฏิกิริยาพีซีอาร์บั่วหลวง จำนวน 46 ตัวอย่าง กับไพรเมอร์ OPF01 โดยนำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอากาโรสเจล ความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกพันธุกรรมบั่วหลวง

4.3.3 ผลการทดลอง

4.3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอและการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของบัว จำนวน 3 สายพันธุ์แท้ และ 16 ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดเพชรบุรี พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ โดยพิจารณาการตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอากาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบแถบดีเอ็นเอปรากฏทั้งหมด ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจะมีระดับความหนา และความคมชัดต่างกัน การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอนั้นประเมินได้จากความหนา และ

ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ 500, 300 และ 100 นาโนกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร ได้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงความเข้มข้นของดีเอ็นเอบัว 19 ตัวอย่าง เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ตัวอย่างหมายเลข	แหล่งรวบรวม	การประเมินความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng / μ l)
1	บัวหลวงพันธุ์ดอกสีขาว	100
2	บัวหลวงขาวซ้อน (บัวฉัตรขาว)	120
3	บัวหลวงชมพูซ้อน (บัวฉัตรชมพู)	150
4	อำเภอบ้านลาด 1	150
5	อำเภอบ้านลาด 2	140
6	อำเภอชะอำ 1	60
7	อำเภอชะอำ 2	90
8	อำเภอยายาย 1	180
9	อำเภอยายาย 2	200
10	อำเภอเมือง 1	90
11	อำเภอเมือง 2	90
12	อำเภอเขาชัย 1	120
13	อำเภอเขาชัย 2	120
14	อำเภอบ้านแหลม 1	80
15	อำเภอบ้านแหลม 2	120
16	อำเภอแก่งกระจาน 1	150
17	อำเภอแก่งกระจาน 2	60
18	อำเภอหนองหญ้าปล้อง 1	70
19	อำเภอหนองหญ้าปล้อง 2	80

4.3.3.2 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบัวด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ชุดไพรเมอร์จำนวน 155 หมายเลข ได้แก่ ไพรเมอร์ชุด OPE, OPH, OPK, OPJ, OPN, OPF, OPB, OPO, OPG และ OPD

ไพรเมอร์ชุด OPE พบว่าหมายเลข OPE06, OPE08, OPE09 และ OPE12 ปรากฏแถบดีเอ็นเอบัวที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมบัวทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยให้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 1 ถึง 3 แถบ ดังแสดงใน

ตารางภาคผนวกที่ 1 และไพรเมอร์ OPE01, OPE02, OPE04, OPE05, OPE07, OPE10, OPE11, OPE13, OPE14, OPE15, OPE16, OPE17, OPE18, OPE19 และ OPE20 พบการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่มี ความแตกต่างระหว่างพันธุ์กรรมบัว

ไพรเมอร์ชุด OPJ พบว่าหมายเลข OPJ01, OPJ03, OPJ04, OPJ07, OPJ10 และ OPJ15 ปรากฏ แถบดีเอ็นเอบัวที่แสดงความแตกต่างทางพันธุ์กรรมบัวทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยให้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 3 ถึง 5 แถบ ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 2 และ ไพรเมอร์ OPJ02, OPJ05, OPJ06, OPJ08, OPJ9, OPJ11, OPJ12, OPJ13, OPJ15, OPJ16, OPJ18, OPJ19 และ OPJ20 พบการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่มี ความแตกต่างระหว่างพันธุ์กรรมบัว

ไพรเมอร์ชุด OPG พบว่าหมายเลข OPG01, OPG05 และ OPG09 ปรากฏแถบดีเอ็นเอบัวที่แสดง ความแตกต่างทางพันธุ์กรรมบัวทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยให้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 2 ถึง 5 แถบ ดังแสดงในตาราง ภาคผนวกที่ 3 และ ไพรเมอร์ OPG02, OPG03, OPG04, OPG06, OPG07, OPG08, OPG10, OPG11, OPG12, OPG13, OPG14, OPG15, OPG16, OPG17, OPG18, OPG19 และ OPG20 พบการปรากฏแถบดี เอ็นเอที่ไม่มี ความแตกต่างระหว่างพันธุ์กรรมบัว

ไพรเมอร์ชุด OPD พบว่าหมายเลข OPD20 ปรากฏแถบดีเอ็นเอบัวที่แสดงความแตกต่างทาง พันธุ์กรรมบัวทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 4 และ ไพรเมอร์ OPD01, OPD02, OPD03, OPD04, OPD05, OPD06, OPD07, OPD08, OPD09, OPD10, OPD11, OPD12, OPD13, OPD14, OPD15, OPD16, OPD17, OPD18 และ OPD19 พบการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่มี ความแตกต่างระหว่างพันธุ์กรรมบัว

ไพรเมอร์ชุด OPO พบว่าหมายเลข OPO16 ปรากฏแถบดีเอ็นเอบัวทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยให้แถบดี เอ็นเอ 3 แถบ ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 5 และ ไพรเมอร์ OPO01, OPO02, OPO03, OPO04, OPO05, OPO06, OPO07, OPO08, OPO09, OPO10, OPO11, OPO12, OPO13, OPO14, OPO15, OPO17, OPO18, OPO19 และ OPO20 พบการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่มี ความแตกต่างระหว่างพันธุ์กรรมบัว

ไพรเมอร์ชุด OPB พบว่าหมายเลข OPB05 ปรากฏแถบดีเอ็นเอบัวทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยให้แถบดี เอ็นเอ 1 แถบ ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 6 และ ไพรเมอร์ OPB06, OPB07, OPB11, OPB12, OPB13, OPB14, OPB16, OPB18, OPB19 และ OPB20 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างทางพันธุ์กรรมบัว

ไพรเมอร์ชุด OPH พบว่าหมายเลข OPH013 และ OPH20 ปรากฏแถบดีเอ็นเอบัวทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยให้แถบดีเอ็นเอ 4 แถบดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 7 และ ไพรเมอร์ OPH01, OPH02, OPH03, OPH04, OPH05, OPH06, OPH07, OPH08, OPH09, OPH10, OPH11, OPH12, OPH14,

OPH15, OPH16, OPH017, OPH18 และ OPH19 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมบัว

ไพรเมอร์ชุด OPK พบว่าหมายเลข OPK01, OPK05, OPK12, OPK14 และ OPK18 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมบัว

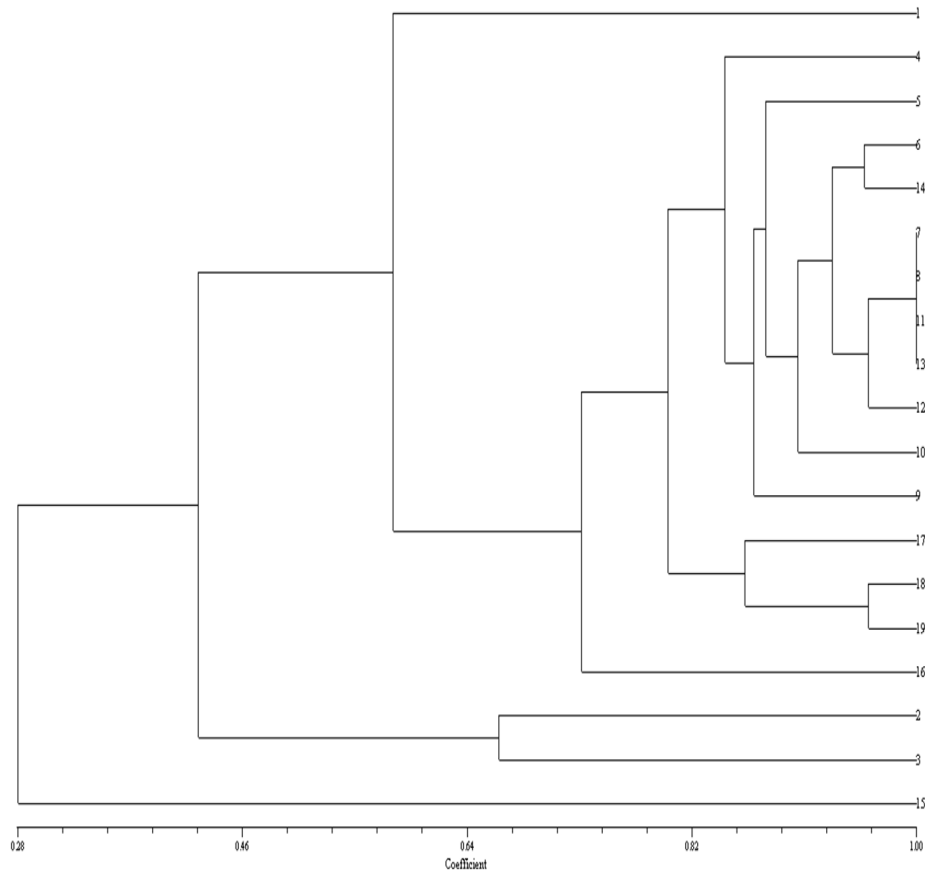
ไพรเมอร์ชุด OPN พบว่าหมายเลข OPN02, OPN03, OPN04, OPN07, OPN08, OPN10, OPN11, OPN14, OPN16, OPN17 และ OPN20 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมบัว

ไพรเมอร์ชุด OPF พบว่าหมายเลข OPF03, OPF06, OPF07, OPF08, OPF09, OPF10, OPF11, OPF14, OPF16 และ OPF20 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมบัว

ตารางที่ 4.11 ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างในบัวหลวง 3 สายพันธุ์แท้ และ

16 ตัวอย่างสุ่ม

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความต่าง
OPG11	1
OPG12	1
OPJ01	3
OPJ03	3
OPJ04	5
OPJ07	1
OPJ10	2
OPJ15	2
OPD20	1
OPO16	3
OPB05	1
OPH13	4
OPH20	4
OPE06	1
OPE08	2
OPE09	3
OPE12	3
รวม	40



รูปที่ 4.18 เดนโดแกรม (dendrogram) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างบัว (lotus) 19 ตัวอย่าง

ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้เทคนิค RAPD แหล่งอำเภอกที่เก็บตัวอย่างบัว

1 = บัวหลวงพันธุ์ดอกสีขาว, 2 = บัวหลวงขาวซ้อน (บัวฉัตรขาว), 3 = บัวหลวงชมพูซ้อน (บัวฉัตรชมพู),
 4 = บ้านลาด 1, 5 = บ้านลาด 2, 6 = ชะอำ 1, 7 = ชะอำ 2, 8 = ท่ายาง 1, 9 = ท่ายาง 2, 10 = อำเภอมือง
 1, 11 = อำเภอมือง 2, 12 = เขาย้อย 1, 13 = เขาย้อย 2, 14 = บ้านแหลม 1, 15 = บ้านแหลม 2,
 16 = แก่งกระจาน 1, 17 = แก่งกระจาน 2, 18 = หนองหญ้าปล้อง 1, และ 19 = หนองหญ้าปล้อง 2

4.4 กิจกรรมที่ 4 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงราชินีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.4.1 ผลการทดลอง

4.4.1.1 ตอนที่ 1 การสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีที่แตกต่างกันให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกันเรียงลำดับดังนี้ แสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวง

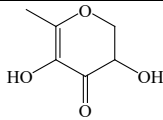
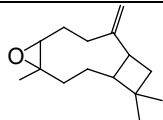
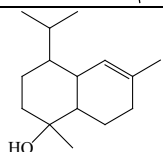
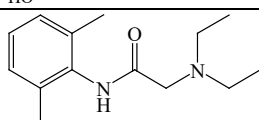
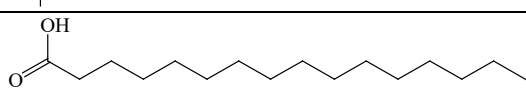
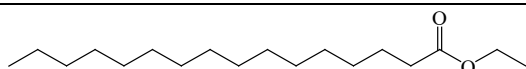
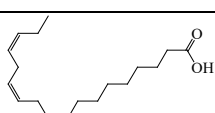
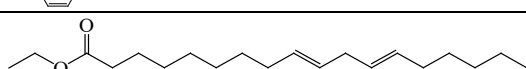
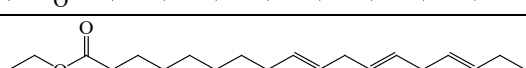
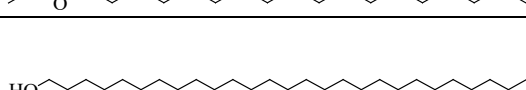
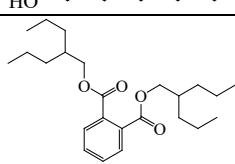
วิธีการสกัด	น้ำหนักเกสร (กรัม)	ลักษณะ น้ำมันหอม ระเหย	น้ำหนักน้ำมันหอม ระเหย (กรัม)	ร้อยละน้ำมันหอมระเหย ที่ได้ต่อน้ำหนักเกสรสด (%wt/wt)
การสกัดด้วยตัวทำละลาย	26.1455	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม	0.9782	3.74
การสกัดด้วยไชเย็น	404.250	ของเหลวใสสี เหลือง	0.6250	0.16
การสกัดด้วยไชร้อน	36.000	ของเหลวใสสี เหลืองเข้ม	1.3520	3.76

4.4.1.2 ตอนที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้วิธีการสกัดแตกต่างกัน

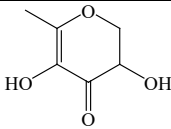
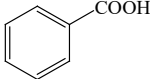
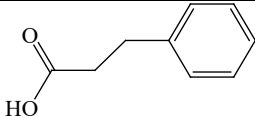
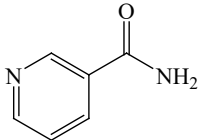
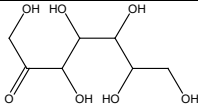
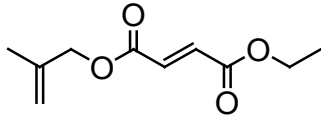
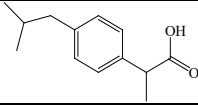
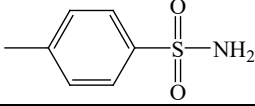
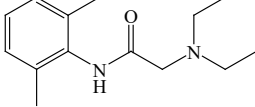
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

น้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิดดังแสดงในตารางที่ 4.13-4.15

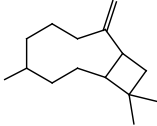
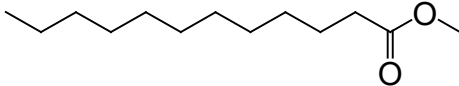
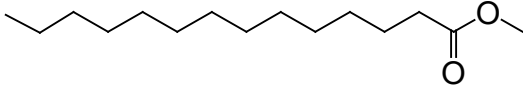
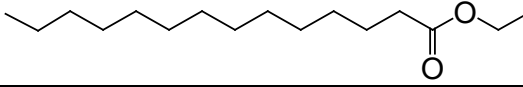
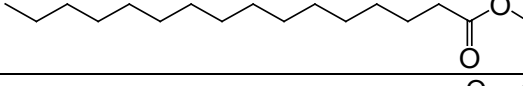
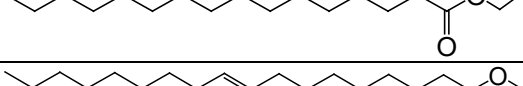
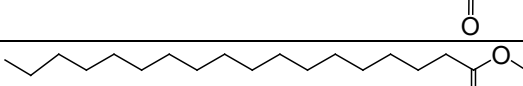
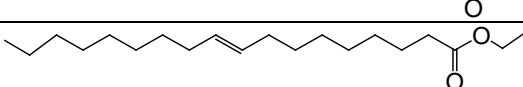
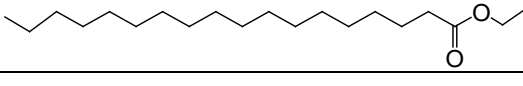
ตารางที่ 4.13 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยเอทานอล

RT	องค์ประกอบทางเคมี (%area)	โครงสร้าง
8.277	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methylpyran-4-one (10.25)	
14.381	caryophyllene oxide (36.7)	
15.160	α -cadinol (17.97)	
17.759	lidocaine (43.68)	
18.201	palmitic acid (100)	
18.537	ethyl palmitate (76.18)	
19.894	9Z,12Z,15Z-octadecatrienoic acid (30.56)	
20.115	ethyl 9,12-octadecadienoate (18.7)	
20.179	ethyl 9,12,15-octadecatrienoate (47.1)	
23.325	1-heptacosanol (76.74)	
24.165	di(2-propylpentyl) phthalate (35.05)	

ตารางที่ 4.14 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยไยเย็น

RT	องค์ประกอบทางเคมี (%area)	โครงสร้าง
8.448	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methylpyran-4-one (26.14)	
8.701	benzoic acid (37.99)	
11.174	hydrocinnamic acid (31.67)	
12.019	niacinamide (11.69)	
12.662	galacto-heptulose (99.49)	
14.232	ethyl 2-methylallyl fumarate (33.02)	
14.806	ibuprofen (22.27)	
15.373	benzenesulfonamide-4-methyl (12.39)	
17.945	lidocain (20.11)	

ตารางที่ 4.15 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยไชร้อน

RT	องค์ประกอบทางเคมี (%area)	โครงสร้าง
12.512	caryophyllene (12.19)	
13.638	methyl dodecanoate (12.22)	
15.952	methyl tetradecanoate (28.24)	
16.693	ethyl tetradecanoate (25.99)	
18.049	methyl palmitate (30.70)	
18.712	ethyl palmitate (71.9)	
19.741	(E)-methyl octadec-9-enoate (43.89)	
19.959	methyl stearate (14.40)	
20.343	ethyl oleate (100)	
20.558	ethyl stearate (57.77)	

4.4.1.3 ตอนที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี DPPH

การศึกษากการต้านออกซิเดชันอาศัยการฟอกจางสีของ DPPH และติดตามผลการทดลองโดยวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการดูดกลืนแสงของ DPPH ผลดังตารางที่ 4.16-4.18

4.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงด้วย DPPH ดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีสกัด/ชนิดเกรส	ค่าการดูดกลืนแสง				ร้อยละการยับยั้ง $\pm$ SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
1. การสกัดด้วยเอทานอล	0.045	0.046	0.045	0.045	64.50 $\pm$ 0.00
2. การสกัดด้วยไซเอน	0.125	0.127	0.124	0.125	4.60 $\pm$ 0.00
3. การสกัดด้วยไซร่อน	0.122	0.134	0.132	0.129	1.60 $\pm$ 0.00

น้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลายมีฤทธิ์ยับยั้งมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปหาค่า IC_{50} การยับยั้งออกซิเดชัน ดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 ค่า IC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลาย

ความเข้มข้นสุดท้าย (μ g/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง				ร้อยละ การยับยั้ง	$IC_{50} \pm SD$ (μ g/ml)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
25	0.071	0.069	0.067	0.069	45.60	31 $\pm$ 0.94
50	0.045	0.048	0.043	0.045	64.50	
75	0.043	0.043	0.045	0.044	65.35	
100	0.044	0.043	0.044	0.044	65.35	
125	0.045	0.046	0.045	0.045	64.50	

ค่าการยับยั้งออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลายมีค่า $IC_{50} \pm SD$ เท่ากับ 31.00 $\pm$ 0.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการวิจัยนี้มีวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ดังแสดงค่า IC_{50} ในตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 ค่า IC_{50} ของวิตามินซี

ความเข้มข้นสุดท้าย (μ g/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง				ร้อยละ การยับยั้ง	$IC_{50} \pm SD$ (μ g/ml)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
0.0125	0.135	0.129	0.133	0.132	21.00	0.75 $\pm$ 0.02
0.125	0.130	0.128	0.127	0.128	23.40	
1.25	0.110	0.112	0.120	0.114	32.00	
12.5	0.064	0.062	0.059	0.061	63.50	
125	0.037	0.038	0.039	0.038	77.30	

ค่า $IC_{50} \pm SD$ ของวิตามินซีในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 0.75 $\pm$ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาและการอนุรักษ์บัวหลวงราชินี โดยทำการวิจัยเพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ การเก็บรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินีเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและต่อยอดงานวิจัยบัวหลวงราชินี สามารถพัฒนา หรือฟื้นฟูแหล่งกำเนิดบัวหลวงสายพันธุ์ดังกล่าวให้มีความหนาแน่นมากขึ้น และเป็นการสนองพระราชประสงค์ของสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถในการอนุรักษ์บัวหลวงสายพันธุ์นี้ให้คงอยู่ตลอดไป การดำเนินงานวิจัยมีทั้งหมด 4 กิจกรรมด้วยกันได้แก่

1. การเก็บและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินีในจังหวัดเพชรบุรี ศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงราชินี
2. การใช้วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์บัวหลวงราชินี
3. ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงราชินี
4. การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวราชินีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.1 กิจกรรมที่ 1 การสำรวจและเก็บรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี

4.1.1 การเก็บและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี ที่มีในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี มีทั้งหมด 8 แหล่งด้วยกัน คือ คลองชลประทานหน้าวัดหนองผาถ่าน ตำบลดอนขุนห้วย อำเภอลำทะเมนชัย บ้านเหมืองหม้อ หมู่ที่ 4 ตำบลลาดโพธิ์ อำเภอบ้านลาด คลองชลประทาน ตำบลท่าค้อย อำเภอยางชุมน้อย คลองชลประทานหมู่ที่ 2 ตำบลห้วยท่าช้าง อำเภอเขาย้อย คลองชลประทานบ้านใหม่หมู่ที่ 4 ตำบลโพธิ์ไร่หวาน อำเภอเมืองเพชรบุรี บึงบัวของรีสอร์ททิวา ซัมบาล่า หรือ มูลนิธิวิทยาศาสตร์ทางจิตเพื่อการพัฒนา อำเภอนางรอง หนองหญ้าปล้อง คลองชลประทาน หมู่ที่ 2 ตำบลท่าแร้ง อำเภอบ้านแหลม และบึงบัวใต้เขื่อนแก่งกระจาน อำเภอกำแพงแสน

4.1.2 การสำรวจและศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงราชินี บัวหลวงราชินี เป็นบัวสายพันธุ์หนึ่ง ที่จัดอยู่ในกลุ่มบัวหลวงพุ่มซึ่งบัวสายพันธุ์นี้เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ในแหล่งน้ำธรรมชาติที่ไหลผ่านตลอดและน้ำค่อนข้างสะอาดมีลักษณะเด่น คือ ลำต้นสูงใหญ่ ก้านใบยาวมากกว่า 2 เมตร ใบโตเต็มที่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 60 เซนติเมตร ใบไม่จับน้ำ ก้านใบแข็ง (ตารางที่ 4.1 รูปที่ 4.1 และ รูปที่ 4.2) ซึ่งพบว่าความยาวก้านใบของบัวหลวงราชินีของอำเภอยางชุมน้อยและอำเภอนางรองมีก้านใบที่ไม่ถึง 2 เมตรซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 99.99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมและสภาพภูมิประเทศของพื้นที่ของสองอำเภอนี้ เพราะอำเภอยางชุมน้อยเป็นแหล่งที่ตั้งของโรงงานอุตสาหกรรม และมีสภาพพื้นที่ดอนมากกว่าที่ลุ่ม และมีน้ำขังเฉพาะในช่วงฤดูฝน ดังนั้นจึงทำให้เส้นรอบวงของใบ ความกว้างของใบ และจำนวนเส้นใบน้อยกว่าบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอนางรอง จึงทำให้มีก้านใบสั้นและขนาดใบเล็กกว่าแหล่งอื่นๆ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ และ 99.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอำเภอนางรองมีสภาพเป็นที่ราบสูงสลับด้วยภูเขาจึงพบได้น้อยกว่าอำเภอนางรอง แหล่งที่พบจึงเป็นบึงบัวธรรมชาติอยู่ในสถานที่ของเอกชน บัวหลวง

ราชินีที่พบในอำเภอเมืองเพชรบุรี อำเภอชะอำ อำเภอท่ายาง อำเภอบ้านลาด อำเภอบ้านแหลม และอำเภอแก่งกระจานจะมีลักษณะก้านใบยาวมากกว่า 2 เมตร และมีขนาดของใบหรือความกว้างใบมากกว่า 60 เซนติเมตร และบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอเมืองเพชรบุรี มีความยาวก้านใบมากที่สุดเท่ากับ 250.25 เซนติเมตร รองลงมาคือ บัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอชะอำ ซึ่งแหล่งที่พบมักจะเป็นคลองชลประทาน คูคลองธรรมชาติ ค่อนข้างลึก มีน้ำไหลผ่านตลอดเวลา และน้ำใสสะอาด สำหรับบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอท่ายางมีใบใหญ่มากที่สุดโดยมีความกว้างใบเท่ากับ 74.45 เซนติเมตร

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยของความยาวก้านใบ เส้นรอบวงของก้านใบ (วัดจากโคนใบลงไป 50 ซม.) ความกว้างของใบ และจำนวนเส้นใบ

แหล่งบัวหลวงราชินี	ความยาวก้านใบ (ซม.)	เส้นรอบวงของก้านใบ (ซม.)	ความกว้างของใบ (ซม.)	จำนวนเส้นใบ (เส้น)
อำเภอชะอำ	242.75 ^a	5.45 ^a	71.80 ^a	22.50 ^a
อำเภอบ้านลาด	216.00 ^{ab}	4.80 ^a	65.55 ^a	22.00 ^{ab}
อำเภอท่ายาง	225.50 ^{ab}	5.05 ^a	74.45 ^a	23.00 ^a
อำเภอเขาย้อย	123.90 ^c	3.55 ^b	46.10 ^b	20.50 ^c
อำเภอเมืองเพชรบุรี	250.25 ^a	5.00 ^a	63.75 ^a	22.25 ^a
อำเภอหนองหญ้าปล้อง	161.25 ^{bc}	4.60 ^{ab}	66.00 ^a	22.00 ^{ab}
อำเภอบ้านแหลม	215.25 ^{ab}	5.45 ^a	73.60 ^a	22.25 ^a
อำเภอแก่งกระจาน	201.90 ^{ab}	4.25 ^{ab}	65.90 ^a	20.75 ^{bc}
F-test	***	**	***	***
CV (%)	17.29	11.70	11.01	2.98

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

*** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99.99%



รูปที่ 4.1 ก้านดอก ก้านใบยาวมากกว่า 2 เมตร



รูปที่ 4.2 ขนาดใบใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 60 เซนติเมตร

ดอกบัวหลวงราชินีมีลักษณะรูปทรงรียาวสีชมพูขนาดใหญ่ กลีบดอกไม่ซ้อนมีกลิ่นหอมอ่อนๆ ก้านดอกมีลักษณะแข็ง สีเขียวเหลือบน้ำตาล และก้านดอกยาวมากกว่า 2 เมตร ที่โคนก้านเหนือขึ้นมาจนถึงข้อใบมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเกือบน้ำตาลมีหนามสั้นเล็กๆ ทั่วทั้งก้าน (ตารางที่ 4.2 รูปที่ 4.3 และ รูปที่ 4.4) ซึ่งบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอเขาย้อยมีความยาวก้านดอกสั้นและเล็กที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ดอกบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอยางชุมน้อยมีความยาวก้านดอกมากที่สุดเท่ากับ 246.10 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ ดอกบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอบ้านแหลมเท่ากับ 236.35 เซนติเมตร ซึ่งพบว่าก้านดอกดอกบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอชะอำมีขนาดใหญ่ที่สุดเท่ากับ 5.45 เซนติเมตรซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99.99 เปอร์เซนต์ ส่วนบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภออื่นๆ ทั้ง 7 แห่งพบว่าขนาดของก้านดอกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และดอกบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอชะอำมีขนาดดอกที่ใหญ่ที่สุดโดยมีเส้นรอบวงของดอกและความยาวของดอกสูงสุดเท่ากับ 18.25 เซนติเมตร และ 12.50 เซนติเมตร ตามลำดับรองลงมาคือ ดอกบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอยางชุมน้อยโดยมีเส้นรอบวงของดอกและความยาวของดอกเท่ากับ 18.23 เซนติเมตร และ 11.98 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยของความยาวก้านดอก เส้นรอบวงของก้านดอก (วัดจากโคนดอกลงไป 50 ซม.) เส้นรอบวงของดอก และความยาวของบัวหลวงราชินี

แหล่งบัวหลวงราชินี	ความยาว ก้านดอก (ซม.)	เส้นรอบวง ของก้านดอก (ซม.)	เส้นรอบวง ของดอก (ซม.)	ความยาวของดอก (ซม.)
อำเภอชะอำ	220.50 ^a	5.45 ^a	18.25 ^a	12.50 ^a
อำเภอบ้านลาด	197.25 ^{ab}	3.50 ^b	16.10 ^{ab}	10.70 ^{ab}
อำเภอท่ายาง	246.10 ^a	3.85 ^b	18.23 ^a	11.98 ^a
อำเภอเขาย้อย	148.00 ^b	3.40 ^b	14.03 ^b	10.45 ^{ab}
อำเภอเมืองเพชรบุรี	228.50 ^a	3.85 ^b	14.33 ^b	9.45 ^b
อำเภอหนองหญ้าปล้อง	186.35 ^{ab}	3.75 ^b	16.40 ^{ab}	10.95 ^{ab}
อำเภอบ้านแหลม	236.35 ^a	3.90 ^b	15.30 ^{ab}	10.45 ^{ab}
อำเภอแก่งกระจาน	183.35 ^{ab}	3.60 ^b	16.25 ^{ab}	11.70 ^a
F-test	**	***	*	*
CV (%)	16.04	10.25	13.77	11.37

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%
 *** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99.99%

บัวหลวงราชินีมีกลีบเลี้ยงจำนวน 3-4 กลีบ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยพบว่าดอกบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอชะอำมีแนวโน้มที่มีจำนวนดอกมากกว่าเท่ากับ 4 กลีบ ซึ่งพบว่าบัวหลวงราชินีทั้ง 8 แหล่ง มีจำนวนกลีบดอก 18-20 กลีบ จำนวนเกสรตัวเมีย 22-35 อัน และเกสรตัวผู้จำนวน 350-470 อัน โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอเขาย้อยมีจำนวนของเกสรตัวเมีย และเกสรตัวผู้น้อยกว่าอำเภออื่นๆ ดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.5

A horizontal sequence of eight lotus flowers against a solid orange background, illustrating the stages of growth. From left to right: 1. A small, green, pointed bud on a thin stem. 2. A slightly larger green bud. 3. A green bud with a small pinkish tip. 4. A green bud with more pronounced pink at the tip. 5. A green bud with a large pinkish tip. 6. A bud that is mostly open, showing pink petals. 7. A flower that is almost fully open, with many pink petals visible. 8. A fully bloomed lotus flower with many layers of pink petals, some showing a white center.

รูปที่ 4.4 ดอกบัวหลวงราชินีตั้งแต่ดอกตูมจนดอกบานเต็มที่ที่มีทั้งหมด 8 ระยะ

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยจำนวนกลีบเลี้ยง จำนวนกลีบดอก จำนวนเกสรตัวเมีย และจำนวนเกสรตัวผู้ของบัวหลวงราชินี

แหล่งบัวหลวงราชินี	กลีบเลี้ยง (กลีบ)	กลีบดอก (กลีบ)	เกสรตัวเมีย (อัน)	เกสรตัวผู้ (อัน)
อำเภอชะอำ	4.00	19.75	33.00	432.75
อำเภอบ้านลาด	3.00	19.75	33.50	435.50
อำเภอท่ายาง	3.00	18.25	32.50	422.75
อำเภอเขาย้อย	3.25	18.75	22.00	352.25
อำเภอเมืองเพชรบุรี	3.75	18.25	35.25	449.25
อำเภอหนองหญ้าปล้อง	3.50	20.25	32.75	421.50
อำเภอบ้านแหลม	3.50	18.25	34.25	447.00
อำเภอแก่งกระจาน	3.25	18.00	32.75	420.75
F-test	ns	ns	ns	ns
CV (%)	13.28	7.80	19.13	10.47

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

บัวหลวงราชินีมีฝักใหญ่ มีก้านฝักยาวมากกว่า 2 เมตร มีที่พบในอำเภอเขาย้อยมีความยาวก้านฝักน้อยที่สุดเท่ากับ 177 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ส่วนเส้นรอบวงของก้านฝักใหญ่ที่สุดคือ บัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอชะอำ รองลงมาคืออำเภอบ้านลาดเท่ากับ 4.10 เซนติเมตร และ 4 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ สำหรับบัวหลวงราชินีที่ให้ฝักใหญ่ที่สุดพบในอำเภอชะอำ รองลงมาคืออำเภอแก่งกระจาน โดยมีเส้นรอบวงของฝักเท่ากับ 32.60 เซนติเมตร และ 32.25 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ดังตารางที่ 4.4 บัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอแก่งกระจานให้ความกว้างของฝักมากที่สุดเท่ากับ 11.30 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยความยาวก้านฝัก เส้นรอบวงของก้านฝัก (วัดจากโคนฝักลงไป 50 ซม.) เส้นรอบวงของฝัก ความกว้างของฝักบัวหลวงราชินี

แหล่งบัวหลวงราชินี	ความยาว ก้านฝัก (ซม.)	เส้นรอบวง ของก้านฝัก (ซม.)	เส้นรอบวง ของฝัก (ซม.)	ความกว้างของฝัก (ซม.)
อำเภอชะอำ	224.80 ^{abc}	4.10 ^a	32.60 ^a	10.35 ^{ab}
อำเภอบ้านลาด	214.75 ^{abc}	4.00 ^a	28.70 ^{abc}	9.60 ^{abc}
อำเภอท่ายาง	232.50 ^{abc}	3.55 ^{ab}	31.65 ^{ab}	10.40 ^{ab}
อำเภอเขาย้อย	177.00 ^c	3.20 ^b	24.73 ^c	8.35 ^c
อำเภอเมืองเพชรบุรี	240.75 ^{ab}	3.75 ^{ab}	27.90 ^{bc}	9.68 ^{abc}
อำเภอหนองหญ้าปล้อง	262.65 ^a	3.60 ^{ab}	28.65 ^{abc}	9.13 ^{bc}
อำเภอบ้านแหลม	213.50 ^{abc}	3.35 ^b	25.70 ^c	8.20 ^c
อำเภอแก่งกระจาน	189.55 ^{bc}	3.70 ^{ab}	32.25 ^{ab}	11.30 ^a
F-test	**	**	**	**
CV (%)	12.64	7.43	7.31	9.60

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

บัวหลวงราชินีมีรังไข่มาก มีจำนวนเมล็ดต่อฝักประมาณ 35-47 เมล็ด แต่จะมีเมล็ดดีประมาณครึ่งหนึ่งของฝัก ซึ่งพบว่าบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอบ้านลาดมีจำนวนเมล็ดดีสูงสุด และมีขนาดใหญ่โดยมีเส้นรอบวงของเมล็ดสูงสุดเท่ากับ 23 เมล็ด และ 6.91 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99.99 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเมล็ดบัวหลวงราชินีที่พบในอำเภอแก่งกระจานมีความยาวของเมล็ดมากกว่าอำเภออื่นๆ ทั้ง 7 แหล่ง แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมล็ดมีความยาวเท่ากับ 2.69 เซนติเมตร ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดดีต่อฝัก เส้นรอบวงของเมล็ด และความยาวของเมล็ดของดอกบัวหลวงราชินี

แหล่งบัวหลวงราชินี	จำนวนเมล็ดดีต่อฝัก	เส้นรอบวงของเมล็ด (ซม.)	ความยาวของเมล็ด (ซม.)
อำเภอชะอำ	15.00 ^{ab}	4.74 ^{ab}	2.28
อำเภอบ้านลาด	23.00 ^a	6.91 ^{abc}	2.20
อำเภอท่ายาง	19.50 ^{ab}	4.96 ^a	2.28
อำเภอเขาย้อย	9.00 ^b	4.85 ^{ab}	2.55
อำเภอเมืองเพชรบุรี	21.00 ^a	3.69 ^c	2.42
อำเภอหนองหญ้าปล้อง	15.50 ^{ab}	4.17 ^{abc}	2.43
อำเภอบ้านแหลม	22.00 ^{ab}	3.96 ^{bc}	1.98
อำเภอแก่งกระจาน	18.25 ^{ab}	4.49 ^{abc}	2.69
F-test	***	**	ns
CV (%)	21.68	9.53	6.16

หมายเหตุ

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

*** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99.99%



รูปที่ 4.5 ลักษณะของกลีบดอก เกสรตัว รังไข่ การติดเมล็ด เมล็ดอ่อน และเมล็ดโตเต็มที่ รับประทานได้

4.1.3 การปลูกรวบรวมน้ำพันธุ์บัวหลวงราชินี

ขั้นตอนที่ 1 ได้ถมดินและปรับพื้นที่แปลงปลูกบริเวณขอบสระน้ำ



รูปที่ 4.6 การถมดินและปรับพื้นที่สำหรับการวางวงบ่อซีเมนต์

ขั้นตอนที่ 2 เก็บรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี ในจังหวัดเพชรบุรี



รูปที่ 4.7 การเก็บสายพันธุ์บัวหลวงราชินีในหน้าแล้งสภาพน้ำแห้งและมีน้ำในฤดูฝนจากแหล่งอำเภอย้าย



รูปที่ 4.8 การเก็บสายพันธุ์บัวหลวงราชินีในสภาพน้ำตื้นและมีน้ำลึกจากแหล่งอำเภอย่าง



รูปที่ 4.9 การเก็บสายพันธุ์บัวหลวงราชินีในสภาพน้ำลึกจากแหล่งอำเภอยะอำ

ขั้นตอนที่ 3 ดำเนินการปลูกและขยายพันธุ์ โดยการแยกเหง้า ซึ่งบัวหลวงจะสร้างไหลจากเหง้า (ราก) ของต้นแม่แล้วงอกไปเป็นต้นใหม่ สามารถขยายพันธุ์โดยการตัดเหง้า ให้มีความยาวประมาณ 2-3 ข้อ มีตาประมาณ 3 ตา ต้นอ่อนจะขึ้นจากตา และเจริญเป็นต้นใหม่ (พันธุ์บัว 1 เหง้าควรจะต้องมีตา 3 ตา กรณีที่มีตาไม่ถึง 3 ตา สามารถนำมามัดรวมกันแล้วนับให้ได้ 3 ตา ซึ่งเกษตรกรจะเรียก 1 กำ หรือ 1 จับ) ปลูกและรวบรวมพันธุ์ จาก 8 แหล่งไว้ที่สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร



รูปที่ 4.10 การปลูกและรวบรวมพันธุ์บัวหลวงราชินี



รูปที่ 4.11 การปลูกเลี้ยงสายพันธุ์บัวหลวงราชินีในวงบ่อซีเมนต์



รูปที่ 4.12 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์บัวหลวงราชินีทั้ง 8 แหล่งปลูก

4.2 กิจกรรมที่ 2 การใช้วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์บัวหลวงราชินี

4.2.1 ผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้พบว่า การเจริญเติบโตของบัวหลวงราชินีในช่วง 1-2 เดือนแรกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับการใช้วัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 3 ชนิดนั้น มีแนวโน้มที่มีความสูงและจำนวนใบมากกว่าเมื่อใช้ดินเหนียวที่ปลูกไม่น้ำทั่วไป (ตารางที่ 4. 6) หลังจากปลูกไปแล้ว 4 เดือนพบว่า การใช้ดินเหนียวที่ปลูกไม่น้ำทั่วไปทำให้มีความสูงของต้นหรือก้านใบสูงที่สุดมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 49.67 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.7) จากการสังเกตพบว่าบัวหลวงราชินีจะเจริญเติบโตได้ดีในธรรมชาติหรือในสระน้ำขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.17) เนื่องจากมีพื้นที่กว้างขวางและมีน้ำตลอดเวลา เมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกในวงบ่อซีเมนต์ มีพื้นที่น้อยและมีน้ำจำกัดไม่มากทำให้เจริญเติบโตช้ากว่ามีการออกดอกช้ากว่า และดอกมีขนาดเล็กด้วยเช่นกัน ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าวัสดุปลูกไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของบัวหลวงราชินี ส่วนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตคือน้ำต้องไม่แห้ง และต้องใช้พื้นที่มากกว่าจึงจะเหมาะสมต่อการให้ดอกและดอกที่มีขนาดใหญ่ สำหรับวัสดุปลูกที่ใช้ดินเหนียว

ที่ปลูกไม้หน้าทัวไปผสมกับมูลโคอัตราส่วน 7 : 1 การเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มให้ดอกเร็วกว่าวัสดุอื่นๆ เพราะหลังจากปลูกไปแล้ว 6 เดือนเริ่มให้ดอก และจำนวน 2 ดอก (รูปที่ 4.13 และ 4.16)

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ย ความสูง (ความยาวก้านใบ) ความกว้างใบ เส้นรอบวงของก้านใบ (วัดจากโคนใบลงไป 20 ซม.) และจำนวนใบของบัวหลวงราชินีอายุ 2 เดือน

วัสดุปลูก	ความสูง (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	เส้นรอบวงของก้านใบ(ซม.)	จำนวนใบ (ใบ)
ดินเหนียว	24.70	22.03	1.67	2.67
ดินเหนียวปลูกไม้หน้าทัว	27.03	19.77	1.63	3.33
ดินเหนียวปลูกไม้หน้าทัวผสมมูลโคอัตราส่วน 7 : 1	26.63	21.33	1.57	2.00
F-test	ns	ns	ns	ns
CV (%)	30.68	13.31	7.96	11.37

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยความสูง (ความยาวก้านใบ) ความกว้างใบ เส้นรอบวงของก้านใบ (วัดจากโคนใบลงไป 20 ซม.) และจำนวนใบของบัวหลวงราชินีอายุ 4 เดือน

วัสดุปลูก	ความสูง (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	เส้นรอบวงของก้านใบ(ซม.)	จำนวนใบ (ใบ)
ดินเหนียว	42.67 ^b	34.67	2.27	5.00
ดินเหนียวปลูกไม้หน้าทัว	49.67 ^a	33.20	2.23	5.67
ดินเหนียวปลูกไม้หน้าทัวผสมมูลโคอัตราส่วน 7 : 1	47.47 ^a	34.90	2.10	6.00
F-test	*	ns	ns	ns

CV (%)	7.17	6.30	8.16	26.15
--------	------	------	------	-------

หมายเหตุ

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 4.13 การทดลองปลูกในวงบ่อซีเมนต์และศึกษาวัสดุปลูก 3 ชนิด อายุหลังปลูก 6 เดือน



รูปที่ 4.14 สิ่งทดลองที่ 1 วัสดุปลูกเป็นดินเหนียวตามธรรมชาติ คือ ดินนาทั่วไป



รูปที่ 4.15 สิ่งทดลองที่ 2 วัสดุปลูกเป็นดินเหนียวที่ใช้ปลูกพันธุ์ไม้ในน้ำ



รูปที่ 4.16 สิ่งทดลองที่ 3 วัสดุปลูกเป็นดินเหนียวที่ใช้ปลูกพันธุ์ไม้ในน้ำผสมมูลโคอัตราส่วน 7: 1



รูปที่ 4.17 บัวหลวงราชินีปลูกในสระน้ำ

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสำรวจบัวหลวงราชินีเพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์พบว่าบัวหลวงราชินีมีความยาวของก้านใบเฉลี่ยมากกว่า 2 เมตร จากแหล่งที่พบทั้งหมด 5 อำเภอ ยกเว้น อำเภอเขาย้อย อำเภอหนองหญ้าปล้อง และอำเภอแก่งกระจาน และขนาดของใบซึ่งมีความกว้างเฉลี่ยมากกว่า 60 เซนติเมตร ยกเว้นอำเภอเขาย้อย ส่วนความยาวก้านดอกและขนาดของก้านดอกเฉลี่ยมากกว่า 2 เมตร จากแหล่งอำเภอชะอำ อำเภอท่ายาง อำเภอเมืองเพชรบุรี และอำเภอบ้านแหลม สำหรับดอกมีสีชมพู กลีบไม่ซ้อน มีกลิ่นหอม ขนาดของดอก และฝักมีขนาดใหญ่ที่สุดจากแหล่งอำเภอชะอำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ปริมลภา วสุวัต และเสริมลภา วสุวัต (2548) ว่าบัวหลวงราชินีเป็นบัวสายพันธุ์หนึ่งที่เกิดอยู่ในกลุ่มบัวหลวงปทุม ซึ่งบัวสายพันธุ์นี้มีลักษณะเด่นคือ ลำต้นสูงใหญ่ ก้านใบ และก้านดอกยาวประมาณ 2 เมตร ดอกมีสีชมพูขนาดใหญ่ กลีบดอกไม่ซ้อน มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ฝักใหญ่ มีรังไข่มาก ก้านใบและก้านดอกแข็งสีเขียวเหลือบน้ำตาล ที่โคนก้านเหนือขึ้นมาจนถึงข้อใบเป็นสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเกือบน้ำตาล มีหนามสั้นเล็กๆ ทั่วทั้งก้าน สำหรับข้อมูลของแหล่งปลูกอำเภอเขาย้อยที่มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่าแหล่งปลูกอื่นๆ เพราะเป็นแหล่งปลูกที่มีน้ำตื้นที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากบัวหลวงราชินีจะเจริญเติบโตได้ดีในน้ำสะอาด ได้ทั้งน้ำลึกและตื้น หากน้ำลึกมากจะมีลำต้นค่อนข้างใหญ่ โดยเฉพาะฤดูฝน การพัฒนาบัวเพื่อใช้เป็นพืชเศรษฐกิจใหม่ของไทยประสบความสำเร็จได้จำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือจากทุกภาคส่วนเป็นสำคัญ ทั้งการพัฒนาสายพันธุ์ เทคโนโลยีการผลิต การเกษตรกรรม การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว มาตรฐาน กฎระเบียบข้อบังคับ การตลาดและการวางแผน ตลอดจนการพัฒนาแนวทางการใช้ประโยชน์บัวหลวงที่หลากหลาย โดยเกษตรกร นักวิชาการ นักวิจัย ผู้ส่งออก ผู้ใช้งาน และภาครัฐ เพื่อผลักดันศักยภาพของดอกบัวหลวงสู่ตลาดอาเซียน จนขยายสู่ตลาดเอเชียและก้าวสู่ตลาดโลก (ภาณุพล หงส์ภักดี, 2556) กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการสำรวจและรวบรวมพันธุ์บัวจาก 33 จังหวัดทั่วประเทศ สามารถคัดเลือกบัวหลวงพันธุ์ดีจำนวน 109 สายพันธุ์ และปลูกรวบรวมไว้ตามสถานีทดลองต่างๆ ซึ่งคาดว่าจะได้ใช้ประโยชน์เพื่อพัฒนาพันธุ์ต่อไป (จินตน์กานต์ งามสุทธา, 2555)

การใช้วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์บัวหลวงราชินี โดยทำการปลูกบัวหลวงราชินี ลงในวงบ่อ ซึ่งมีวัสดุปลูกต่างกัน 3 ชนิด 1) ดินเหนียวที่เป็นดินนา 2) ดินเหนียว (ที่ใช้ปลูกไม้ไผ่) และ 3) ดินผสม (ดินเหนียวที่ใช้ปลูกไม้ไผ่ : มูลโค ; 7 : 1) ทำ 3 ซ้ำๆ ละ 1 วงบ่อ ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี พบว่าการเจริญเติบโตของบัวหลวงราชินีในช่วง 1-2 เดือนแรก ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การใช้ดินเหนียวที่ปลูกไม้ไผ่มีแนวโน้มให้ความสูงและจำนวนใบมากกว่า หลังจากปลูกไปแล้ว 4 เดือนพบว่า การใช้ดินเหนียวที่ปลูกไม้ไผ่ทำให้มีก้านใบยาวที่สุดมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ

ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49.67 เซนติเมตร การวิจัยครั้งนี้พบว่าวัสดุปลูกไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของบัวหลวงราชินี สิ่งที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตคือน้ำ สำหรับดินผสม (ดินเหนียวที่ปลูกไม้หน้าผสมกับมูลโคอัตราส่วน 7 : 1) มีการให้ดอกเร็วกว่าวัสดุปลูกอื่นๆ เพราะหลังจากปลูกไปแล้ว 6 เดือนเริ่มให้ดอก

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวในจังหวัดเพชรบุรี พบว่ามีความหลากหลายของพันธุกรรมของบัวโดยใช้เทคนิค RAPD จำนวน 155 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ 80 ไพรเมอร์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน หรือคิดเป็น 51.61 เปอร์เซนต์ กับตัวอย่างบัวทั้งหมด 19 ตัวอย่าง พบว่ามีชุดไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของบัวทั้งหมด 17 ไพรเมอร์ มีทั้งหมด 40 อัลลิล ที่ให้ความแตกต่าง และพบว่ามีเพียงไพรเมอร์เดียวที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของบัวสายพันธุ์แท้ 3 สายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนคือ OPO16 เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัว โดยใช้ UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) มาสร้างเดนโดแกรม (dendrogram) พบว่าสามารถจำแนกบัวได้เป็น 3 กลุ่ม โดยมีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.23 ถึง 1.00 โดยตัวอย่างที่ 7, 8, 11 และ 13 มีค่าดัชนีความเหมือนสูงสุด คือ 1.00 ซึ่งทั้ง 4 ตัวอย่างนี้น่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน จัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 ส่วนตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความเหมือนต่ำสุดอยู่ที่ 0.23 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 15 ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 กับ 3 อยู่ในกลุ่มเดียวกัน มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ที่ 0.67 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 พบว่าบัวกลุ่มที่ 3 มีการกระจายของบัวหลวงดอกสีขาวอยู่ในทุกอำเภอในจังหวัดเพชรบุรี

การสกัดดีเอ็นเอใบอ่อนของบัว (*Nelumbo nucifera*) โดยใช้วิธีการแบบ CTAB extraction สามารถสกัดดีเอ็นเอของบัว และมองเห็นแถบดีเอ็นเอทุกแถบ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจะมีระดับความหนา และความคมชัดต่างกัน โดยประเมินจากการเทียบดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ 500, 300 และ 100 นาโนกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร พบว่า บัว (*Nelumbo nucifera*) ทั้ง 19 ตัวอย่างมีความเข้มข้น 60-160 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากการที่ใช้ไพรเมอร์ทั้ง 155 ไพรเมอร์ ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphism DNA) ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 155 ไพรเมอร์แต่มีไพรเมอร์จำนวน 138 เครื่องหมายที่ไม่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุกรรม และไพรเมอร์ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมของบัว มีทั้งหมด 40 อัลลิล ได้แก่ OPG11, OPG12, OPJ01, OPJ03, OPJ04, OPJ07, OPJ10, OPJ15, OPD20, OPO16, OPB05, OPH13, OPH20, OPE06, OPE08, OPE09 และ OPE12 จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 17 ไพรเมอร์ 40 อัลลิล โดยพิจารณาจากแต่ละตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (1) และไม่ปรากฏ (0) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัว โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.01d และสร้างเดนโดแกรม (dendrogram) โดยใช้ UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) พบว่า ดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมของบัวทั้ง 19 สายพันธุ์ สามารถจัดแบ่งกลุ่มได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 3 กลุ่มนั้นมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.23 ถึง 1.00 โดยตัวอย่างที่ 7, 8, 11 และ 13 มีค่าดัชนีความเหมือนสูงสุด คือ 1.00 ซึ่งทั้ง 4 ตัวอย่างนี้ น่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ส่วนตัวอย่างที่มีค่าดัชนี

ความเหมือนต่ำสุดอยู่ที่ 0.23 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 15 ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 3 และตัวอย่างที่ 2 กับ 3 อยู่ในกลุ่มเดียวกัน มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ที่ 0.67 อยู่ในกลุ่มที่ 2 (รูปที่ 4)

นฤมล ธนนันต์ และมานะ ขาวเมฆ (2549) ได้นำเทคนิคอาร์เอพีดี มาตรวจสอบพันธุ์บัวหลวงในประเทศไทย โดยเก็บบัวหลวง 6 พันธุ์ มาตรวจสอบกับไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ 70 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หรือคิดเป็น 97.22 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นได้คัดเลือกไพรเมอร์ 31 ชนิดที่เพิ่มดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงอย่างชัดเจน มาตรวจสอบกับดีเอ็นเอบัวหลวงทั้งหมด 6 พันธุ์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ โดยไพรเมอร์บางชนิด ให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่ง และพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกบัวหลวงทั้ง 6 พันธุ์ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอในแต่ละพันธุ์สามารถวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ได้สามารถแบ่งบัวหลวง ออกเป็น 2 กลุ่ม มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.87 ซึ่งสอดคล้องกับประวัติและความเป็นมาของการปลูกบัวหลวง และได้้นำเทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบบัวหลวงปัทมาในจังหวัดปทุมธานี การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ 72 ชนิดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า ไพรเมอร์ 70 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หลังจากนั้นจึงเลือกไพรเมอร์ 21 ชนิดที่เพิ่มดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน มาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของบัวหลวงปัทมา 15 ตัวอย่างที่เก็บจาก 7 อำเภอ (อำเภอละ 2 ตำบล ยกเว้นอำเภอคลองหลวงเก็บตัวอย่าง 3 ตำบล) พบแถบดีเอ็นเอรวม 173 แถบ ขนาดประมาณ 350–3200 คู่เบส (base pairs) ซึ่งทำให้เกิดรูปแบบดีเอ็นเอเฉพาะของบัวหลวง ปัทมาแต่ละตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 แบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) พบว่าบัวหลวงปัทมามีความแปรปรวนทางพันธุกรรม genetic variation ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือน 0.91–0.99 ซึ่งสอดคล้องกับการแพร่กระจายของบัวหลวงปัทมาตามลักษณะทางภูมิศาสตร์

จากการศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลาย การสกัดด้วยไชเย็น และการสกัดด้วยไชร้อน พบว่าเกสรบัวหลวงที่สกัดด้วยไชเย็นจะมีลักษณะของเหลวสีเหลืองอ่อน สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากดอกมะลิที่สกัดด้วยไชเย็นนั้นจะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเขียวอ่อน (วิภา พลันสังเกตุ และสโรชา ชื่นกิจ, 2552) ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยเอทานอลสีน้ำตาลเป็นสีเข้มกว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยวิธีอื่นอาจเนื่องจากการสกัดด้วยเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงจึงอาจได้สารเคมีอื่นนอกเหนือจากน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบด้วย ซึ่งการสกัดน้ำมันหอมระเหยวิธีนี้นิยมใช้สำหรับทำยากลุ่มทิงเจอร์หรือกายาน (อรชร เอกภาพสากล, 2547) และเป็นน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียวที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 125 µg/ml มากกว่าร้อยละ 50 สอดคล้องกับงานวิจัยของสุรัตน์วี วงศ์คลัง เลอลักษณ์ เสถียรรัตน์ และอรุณพร อิฐรัตน์ (2557) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่าสารสกัดเอทานอลเกสรบัวหลวงแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ด้วยค่า $ED_{50} > 100$ µg/ml ส่วนน้ำมันหอมระเหยอีก 2 ชนิด

จากการสกัดด้วยไขมัน ไม่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเลย ซึ่งอาจเนื่องจากองค์ประกอบที่มีไขมันสูงที่ถูกสกัดมาจากตัวทำละลายเอทานอลที่ไม่ใช่น้ำมันหอมระเหยนั้นแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ DPPH ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่พบของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดทั้ง 3 วิธีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิด GC-MS พบองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันในวิธีสกัดด้วยตัวทำละลายและไขมันได้แก่ ethyl palmitate โดยมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ร้อยละพื้นที่ใต้กราฟ 76.18 และ 71.90 ตามลำดับ สาร 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methylpyran-4-one และ lidocain พบในปริมาณที่แตกต่างกันในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลายและการสกัดด้วยไขมันเท่านั้น ส่วนองค์ประกอบอื่นๆอีก 7 ชนิดไม่เหมือนกันเลยของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากการสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันสามารถสกัดสารออกมาไม่เหมือนกัน การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งมีไขมันสูงจึงสกัดสารได้หลายชนิด รวมทั้งสารกลุ่มที่ระเหยง่ายและไม่ระเหย ส่วนการสกัดด้วยไขมัน วิธีการสกัดด้วยไขมัน เป็นการเพิ่มความร้อนแก่น้ำมันหอมระเหย และการสกัดด้วยไขมัน ไม่มีการให้ความร้อนในกระบวนการสกัด และในขั้นตอนการแยกน้ำมันหอมระเหยออกจากไขมันนั้น การสกัดด้วยไขมัน จะมีไขมันที่มาจากไขมันปนออกมาด้วย ส่วนการสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยไขมันเป็นวิธีที่ชาวกรีกโบราณนิยมใช้น้ำหอมเพื่อบำรุงผิวพรรณ โดยไม่ได้แยกไขมันออก

สรุปเป็นประเด็นตามกิจกรรมได้ดังนี้

1. บัวหลวงราชินีที่สำรวจพบทั้ง 8 แหล่งมีลักษณะประจำพันธุ์เดียวกันแต่มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างตามสภาพแวดล้อมของแหล่งปลูก โดยเฉพาะขนาดของลำต้นและดอกจะขึ้นอยู่กับสภาพความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติของแหล่งปลูก และความลึกของน้ำ
2. วัสดุปลูกไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของบัวหลวงราชินี สิ่งที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต คือ น้ำ สำหรับดินผสม (ดินเหนียวที่ปลูกไม่เหมาะสมกับมูลโคอัตราส่วน 7 : 1) มีการให้ดอกเร็วกว่าวัสดุปลูกอื่นๆ
3. ความสัมพันธ์ระหว่างบัว 19 ตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค RAPD สามารถจำแนกบัวได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 บัวหลวงจากอำเภอบ้านแหลม กลุ่มที่ 2 บัวหลวงราชินี (บัวฉัตรขาว) และบัวหลวงชมพูซ้อน (บัวฉัตรชมพู) กลุ่มที่ 3 บัวหลวงราชินี (เก็บตัวอย่างจากอำเภอชะอำ อำเภอท่ายาง อำเภอเมือง และ อำเภอเขาย้อย) และ บัวหลวงดอกสีขาว เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการแพร่กระจายของบัวหลวงตามลักษณะทางภูมิศาสตร์
4. การสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยเอทานอล การสกัดด้วยไขมัน และการสกัดด้วยไขมัน น้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายกัน และแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณสาร น้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยไขมันมีลักษณะกลิ่น และลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกัน แต่มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน
5. น้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลายมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ดีกว่าการสกัดด้วยไขมัน

ข้อเสนอแนะและการนำไปใช้ประโยชน์

การเก็บสายพันธุ์บัวหลวงราชินีในช่วงแรกเป็นฤดูร้อน (เดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน) การเก็บง่าย เพราะน้ำมีระดับต่ำ หรือบางแหล่งน้ำแห้งสามารถขุดเหง้าได้ง่าย แต่มีปัญหาเมื่อนำมาปลูกแล้วมีอัตราการรอดตายต่ำ การเก็บพันธุ์บัวหลวงราชินีในฤดูฝน สามารถปลูกและรอดตายได้ดีกว่า แต่พบปัญหาเรื่องระดับน้ำสูง ทำให้การเก็บต้นพันธุ์ หรือเหง้าบัวทำได้ยาก บางแห่งน้ำลึกมาก สำหรับการทำงานวิจัยครั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาบัวหลวงราชินีที่มีในจังหวัดเพชรบุรี

ในส่วนการปลูกบัวหลวงราชินีต้องใช้น้ำเป็นปัจจัยหลักและควรเป็นน้ำสะอาดถึงจะเจริญเติบโตได้ดี และมีการปลูกบัวหลวงในแถบภาคกลาง บริเวณกรุงเทพฯ และปริมณฑลเน้นการผลิตเพื่อตัดดอก แถบอยุธยา อ่างทอง และนครสวรรค์ เน้นการผลิตเพื่อเก็บเมล็ด ตัดดอก และเกสรตากแห้ง ขณะที่ทางจังหวัดปราจีนบุรี ปลูกเพื่อเก็บเกี่ยวไหล (อรรธรรณ วิชัยลักษณ์ และภุรีพันธุ์ สุวรรณเมฆ, ม.ป.ป.) การปลูกเพื่อตัดดอกนิยม ซึ่งนำไปใช้บูชาพระ และปลูกเพื่อเก็บเมล็ด เมล็ดบัวใช้ประกอบอาหารทั้งอาหารคาวและอาหารหวาน ส่วนอื่นๆ ของบัวหลวงที่ใช้ประโยชน์ได้ เช่น ใบแห้ง ใช้ทำยากันยุง มวนบุหรื ต้มเป็นยาไทยบำรุงหัวใจ แก้ไข้ และรักษาโรคตับ ใบสดใช้ห่ออาหาร และไหลหรือรากสามารถนำมาเชื่อมเป็นอาหารหวาน มีสรรพคุณแก้ร้อนใน และระงับอาการท้องร่วง หรือนำใบมาอบแห้งขยี้ดื่มแทนน้ำชาแก้ร้อนในกระหายน้ำ (เศรษฐมนันตร์ กาญจนกุล, 2551 : 57) เมล็ดบัวช่วยบำรุงกำลัง แก้กษัย ท้องร่วง สมานแผล แก้ร้อนใน เจริญอาหาร ช่วยให้กระชุ่มกระชวย ฝักบัว ช่วยขับลม สมานแผล และแก้พิษเบื่อเมา ก้านบัว รักษาโรคลมออกหู และแก้ท้องเดิน เหง้าบัว แก้ท้องเสีย แก้พิษ ฝี ปวดบวม รักษาแผลไฟลวก ช่วยขับปัสสาวะ

เอกสารอ้างอิง

- กรมทรัพยากรธรณี. (2551). การจำแนกเขตเพื่อการจัดการด้านธรณีวิทยาและทรัพยากรธรณีจังหวัด **เพชรบุรี**. กรุงเทพฯ : 90 หน้า 1. ธรณีวิทยา 2. ทรัพยากรธรณี 3. การจำแนกเขต
- กรมวิชาการเกษตร. (2555). สัมมนาวิชาการ การพัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจ ครั้งที่ 10 ‘บัวไทย : การอนุรักษ์ความหลากหลาย’ 17-18 สิงหาคม 2556. สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ.
- จินตน์กานต์ งามสุทธา. (2555). ลู่ทางการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับบัวหลวง. **นสพ.กสิกร**. 5: 25-30.
- จุลภาค คุ่นวงศ์. (2543). การปรับปรุงพันธุ์. ฐานข้อมูลการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สืบค้นเมื่อ 11 พฤษภาคม 2558 จาก : <http://kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC4501028.pdf> (5 ธันวาคม 2553).
- ชมรมผู้รักบัวแห่งประเทศไทย .(2543). **ปัจจัยพื้นฐานในการปลูกบัว**. สืบค้นได้จาก : http://www.thaiwaterlily.com/knowledge_see.asp
- ชุมพล มากทอง และภูมิพัฒน์ ศิริพลานนท์. (2552). ผลการใช้สารเคลือบผิวต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยว ของดอกบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช. **วารสารวิจัยรามคำแหง (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)** 12 (1)
- ชลีพร เตชะศิลป์พิทักษ์. (ม.ป.ป.) **บัวหลวงพื้นเมืองในประเทศไทย**.
- ทวีพงศ์ สุวรรณโร. (ม.ป.ป.). **การทำนาบัว**. กองส่งเสริมพืชสวน.
- ธีระชัย ธนानันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2543). เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 8 (1) : 6-10.
- นฤมล ธนานันต์ รุจิเรข นพเกสร และธีระชัย ธนานันต์. (2554). “การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีศึกษาความสัมพันธ์ ของพุดสกุลการ์ดิเนีย”. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**. 1(16) : 41-46.
- นฤมล ธนานันต์ และมานะ ขาวเมฆ. (2549). การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี **วารสารวิจัยและพัฒนาวลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์**. 1 (3) : 15- 23.
- บ้านบัวปางอุบล .(2556). **บัวหลวง**. สืบค้นได้จาก : <http://www.thaiwaterlily.com/index.php>
- ประเทืองศรี สิ้นชัยศรี. (2547). **พรรณพืชหอมและน้ำมันหอมระเหย**. นนทบุรี: สำนักพิมพ์นีนอบู้ค มีเดีย.
- ปริมลภา วสุวัต และเสริมลภา วสุวัต. (2548). **บัวประดับในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ : เนชั่นบุ๊คส์ อินเตอร์เนชั่นแนลจำกัด.
- พร้อมจิต ศรีลัมพ์, วงศ์สถิต ฉั่วกุล และสมภพ ประธานธูรกิจ. (2548). **สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 1 สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง . หน้า 130.

พิพิธภัณฑบัว. (2556). **ดินปลูกบัว**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. สืบค้นเมื่อ 22 พฤษภาคม

2558 จาก : <http://suksusee.wordpress.com>

ภาณุพล หงส์ภักดี. (2556). บัวหลวง : ศักยภาพไม้ดอกไทยสู่ตลาดอาเซียน. **วารสารแก่นเกษตร**.

41 (3) 213-220.

ไมตรี สุทธิจิตต์ และวรพล เองวานิช. (2555). **อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ**. นนทบุรี :

สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย (สวอ.). 431 หน้า.

รัตนา อินทรานุกกรณ์. (2553). **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพรมะเขือเทศ**. กรุงเทพฯ :

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 215 หน้า.

วลัยลักษณ์ หัตถบุรณ์ และเจษฎา เต็นดวงบริพันธ์. (2554). เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์

เศรษฐกิจและการระบุเพศของสละหม้อจากจังหวัดจันทบุรีพืชสกุลระกำ (Salacca).

วิทยาศาสตร์ มศว. 27, 2 (ธ.ค. 2554): 179-191.

วิภา พลันสังเกต และสโรชา ชื่นกิจ. (2552). **การพัฒนาไข่แพะเพื่อใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี**

อองเฟลอราก. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณครั้งที่ 19 ประจำปี

2552.

ศิริณี พูนไชยศรี และเพชร ช่างชัย. (2536). เพลี้ยไฟกับบัวหลวง. **กีฏและสัตววิทยา**. 15 (3) : 163-164.

ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย. (2549). **ดอกบัว : ไม้ตัดดอกยอดนิยมในช่วงวันสำคัญทางศาสนา**. สืบค้นเมื่อ 4 ตุลาคม

2558 จาก : <http://www.kasikornresearch.com/TH/K->.

เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล. (2551). **ร้อยพรรณพฤกษา บัว**. กรุงเทพฯ : เศรษฐศิลป์.

สมภพ ประธานธรรักษ์ และพร้อมจิต ศรีลัมพ์. (2547). **สมุนไพรมะเขือเทศเพื่อการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืน**.

พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: เพื่องฟ้า. 165 หน้า.

สมวงศ์ ตระกูลรุ่ง. (2543). **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรัตน์วดี วงศ์คลัง, เลอลักษณ์ เสถียรรัตน์และอรุณพร อิฐรัตน์. (2557). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของบัวหลวง**.

ว. วิทย. กษ. 45 (2) (พิเศษ): 673-376.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

สุวรรินทร์ บำรุงสุข และธรรมทิพย์ ทิพย์วงศ์. (2546). **แมลงศัตรูที่สำคัญของบัว**. **วิทยาศาสตร์เกษตร**. 34 (1-3)

พิเศษ: 112-114.

เสริมลาภ วสุวัต . (2543). **การดูแลรักษาบัว** . สืบค้นเมื่อ 2 สิงหาคม 2558 จาก :

http://www.thaiwaterlily.com/knowledge_see.asp

- เสริมลาภ วสุวัต. และปริมลาภ (วสุวัต) ชูเกียรติมัน. (2547). **บัวประดับในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ : เนชั่นบุ๊คส์. 192 หน้า.
- เสาวนีย์ จักรพิทักษ์. (2542). **โภชนาการสำหรับครอบครัวและผู้ป่วย**. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิชย์. 139 น.
- อรชร เอกภาพสากล. (2547). **มหัศจรรย์น้ำมันหอมระเหย**. กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์เพชรการเรือน. 200 หน้า.
- อรรณณ วิชัยลักษณ์ และภุริพันธุ์ สุวรรณเมฆ. (ม.ป.ป.) **การผลิตบัวหลวงตัดดอก**. สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- โอภา วัชรคุปต์. (2550). **สารต้านอนุมูลอิสระ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: นิเวศมิตรการพิมพ์.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.** 19: 11-15. Fleischmann
- FRYNN.COM. (2016). **บัวหลวง สรรพคุณและประโยชน์ของดอกบัวหลวง 83 ข้อ**. สืบค้นเมื่อ 22 สิงหาคม 2559 จาก <http://frynn.com/%E0%B8%9A%E0%B8%B1%E0%B8%A7%E0%B8%AB%E0%B8%A5%E0%B8%A7%E0%B8%87/>
- Hudson, B. J., (1990). **Food antioxidants**. Elsevier Science:London.
- Kim T., Kim H. J., Cho S. K., Kang W. Y., Baek H., Jeon H. Y., Kim B., Kim D. (2011). *Nelumbo nucifera* extracts as whitening and anti-wrinkle cosmetic agent . **Korean J. Chem. Eng.**, 28(1), 424-427.
- Venkatesh B. and Dorai A. (2011). **Antibacterial and antioxidant potential of white and pink *Nelumbonuciera* Gaertn Flowers**. International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics IPCBEE. V.5, Singapore: IACSIT Press.
- Welsh, J., and McClelland, M. (1990). **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers**. *Nucleic Acids. Res.*18:7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.U. (1990). **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers**. *Nucleic Acids Res.* 8 (22): 6531-6535.
- Zheng L.-Z., Wu Y.-B., Wu J.-G., Tan C.-J., Yi J., Chen T.-Q. and Wu J.-Z. (2012). Antioxidant activity of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) receptacles of eleven cultivars grown in China. **Journal of Medicinal Plants Research**. V. 6(10), 1902-1911.