

บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงินลูกผสมต้นแรกของโลก

Nymphaea 'Siam Blue Hardy': The World's First Blue Hardy Waterlily

ไพรัตน์ ทรงพานิช^{1/} วิภา หงษ์ตระกูล^{2/}
Pairat Songpanich^{1/} Vipa Hongtrakul^{2/}

ABSTRACT

Studies on the intersubgeneric pollination of genus *Nymphaea* to achieve the goal as a Blue Hardy Waterlily. Five cultivars from the subgenus *Nymphaea* were used as the pod parents, selected from a sample with a good history of smooth fruiting, beautiful and rich flowerings. As for the pollen, the subgenus *Anecphya* and *Brachyceras* were used, specifically the blue flowering ones in the hope of transferring the genetic traits onto the offspring. Two of the pollen parents were *Anecphya* and twenty were *Brachyceras*. The study was conducted at the nursery, Nonthaburi, Pathum Thani provinces and Kasetsart University during 2003-2007. According to the pollination of subgenus *Nymphaea* with subgenus *Anecphya*, the test results were unsuccessful because of both subgenus were large different in the chromosome numbers. On the other hand, the pollination between subgenus *Nymphaea* and *Brachyceras* yielded one successful pod which were cultivated into 20 plants. The characteristics of hybrids had been categorized by their colours and divided into two groups namely the pink group with 17 hybrids and the blue group with 3 hybrids. In the blue group, there was one which had a beautiful blue-purple flower. Which had also been proven to be a hybrid between *Nymphaea* and *Brachyceras* by the use of the molecular marker method (PCR-RFLP Marker) and morphological marker method. The important characteristics of the hybrid obtained are likely that of a Hardy, making the blue-purple the new colour for the Hardy. The hybrid is then called to be the First Blue Hardy Waterlily in the world and given the name *Nymphaea* 'Siam Blue Hardy'.

Key words: waterlily, blue hardy, pollination, intersubgeneric, hybrid, subgenus, *Anecpha*, *Brachyceras*, *Nymphaea*

^{1/} 129/106 หมู่บ้านเพชรเฟื้องเพลส ซ.ไทรมา ถ.รัตนวิเบศร์ ต.บางรักน้อย อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000

^{2/} ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} 129/106 Perfect Place - Rattanaibet, Rattanaibet Road, Meaung district, Nonthaburi province, 11000

^{2/} Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900

บทคัดย่อ

ศึกษาการผสมพันธุ์บัวข้ามสกุลย่อยสกุล *Nymphaea* เพื่อให้ได้บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงิน โดยใช้พันธุ์บัวในสกุลย่อย *Nymphaea* เป็นแม่ ซึ่งคัดเลือกจากต้นที่มีประวัติการติดฝักง่าย ดอกสวยงามและให้ดอกตก จำนวน 5 พันธุ์ (cultivars) ส่วนต้นพ่อใช้พันธุ์บัวในสกุลย่อย *Anecphyta* และ *Anecphyta* โดยเลือกเฉพาะต้นที่ให้ดอกในกลุ่มสีน้ำเงิน ทั้งนี้เพื่อหวังผลจากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของสีน้ำเงินจากต้นพ่อไปสู่รุ่นลูก ได้คัดเลือกพันธุ์จาก *Anecphyta* จำนวน 2 พันธุ์ และ *Anecphyta* จำนวน 20 พันธุ์ ดำเนินการที่เรือนเพาะชำ จ.นนทบุรี จ.ปทุมธานี และห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ระหว่างปี พ.ศ. 2546 – 2550 พบว่าผสมบัวสกุลย่อย *Nymphaea* ผสมกับ *Anecphyta* ไม่ประสบความสำเร็จ ส่วนบัวสกุลย่อย *Nymphaea* ผสมกับ *Anecphyta* ประสบความสำเร็จ 1 คู่ผสมที่สามารถติดฝัก และนำไปเพาะสามารถเจริญเติบโตได้จำนวน 20 ต้น ทำการแบ่งลูกผสมตามสีดอกได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มสีชมพู 17 ต้น และกลุ่มสีน้ำเงิน 3 ต้น ในกลุ่มสีน้ำเงิน 1 ต้นสามารถคัดเลือกได้ดอกมีสีม่วง-น้ำเงินที่มีความสวยงาม และได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นลูกผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย *Nymphaea* กับ *Anecphyta* ซึ่งได้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบเครื่องหมายโมเลกุลโดยเทคนิค PCR-RFLP marker และพิสูจน์ได้อีกว่าลูกผสมมีลักษณะที่สำคัญส่วนใหญ่เป็นของบัวฝรั่ง ดังนั้นการที่ลูกผสมให้ดอกสีม่วง-น้ำเงิน นับได้ว่าเป็นสี

ใหม่ที่ยังไม่เคยปรากฏมาก่อนในบัวฝรั่ง ลูกผสมนี้จึงเป็น “บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงินต้นแรกของโลก” ซึ่งได้รับการตั้งชื่อว่า *Nymphaea* ‘Siam Blue Hardy’

คำหลัก: บัว บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงิน การผสมพันธุ์ ลูกผสม สกุลย่อย *Anecphyta*, *Brachyceras*, *Nymphaea*

คำนำ

“บัว” จัดเป็นพืชน้ำที่มีทั้งชนิดล้มลุกและยืนต้น พบได้ทั่วไปทั้งเขตร้อน เขตอบอุ่นและเขตหนาว ลักษณะลำต้นเป็นลำต้นใต้ดิน (rootstock) มีทั้งที่เป็นเหง้า ไทล หน่อและหัว ใบเป็นใบเดี่ยวเจริญขึ้นจากลำต้น โดยมีก้านใบส่งขึ้นมาเจริญที่ผิวน้ำหรือชูเหนือน้ำ รูปร่างของใบส่วนใหญ่กลมและมีหลายแบบ ฐานใบแยกกางออกตรงจุดต่อของใบ ดอกเป็นดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ดอกมีสีส้มแตกต่างกันแล้วแต่ชนิด ก้านดอกยาวจะช่วยชูดอกให้โผล่พ้นหรือเหนือน้ำ ก้านใบและก้านดอกอาจมีขน ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4-6 กลีบ กลีบดอกมีทั้งกลีบซ้อนมากซ้อนน้อยแตกต่างกันไป ดอกที่ได้รับการผสมเกสรจะเจริญเป็นผลหรือเรียกว่าฝัก (pod)

ในอดีตบัวสกุลต่างๆจัดอยู่ในวงศ์ *Nymphaeaceae* มีอยู่ด้วยกันประมาณ 10 สกุล แต่ในปัจจุบันนักอนุกรมวิธานพืชได้มีการจัดหมวดหมู่บัวใหม่ โดยวงศ์ *Nymphaeaceae* (Anon, 2008b) ประกอบด้วย 6 สกุล ได้แก่

Barclaya, *Euryale*, *Nuphar*, *Nymphaea*, *Ondinea* และสกุล *Victoria* ส่วนสกุล *Nelumbo* ถูกแยกออกมาตั้งเป็นวงศ์ใหม่ชื่อวงศ์ *Nelumbonaceae* (Anon, 2008a) บัวที่นิยมปลูกกันในประเทศไทย เพื่อเป็นไม้ดอก-ไม้ประดับมีอยู่ด้วยกัน 3 สกุล ได้แก่ *Nymphaea*, *Victoria* และสกุล *Nelumbo* สำหรับบัวสกุล *Nymphaea* แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (group) คือ *Apocarpiae* และ *Syncarpiae* โดยในกลุ่มแรกประกอบด้วย 2 สกุลย่อย (subgenus) ได้แก่ *Anecphyta* (บัวยักษ์ออสเตรเลีย) และ *Brachyceras* (บัวผัน บัวเฟื่อน บัวจงกลณี) ส่วนกลุ่มหลังคือ *Syncarpiae* ประกอบด้วย 3 สกุลย่อย ได้แก่ *Hydrocallis* (ไม่มีปลูกในประเทศไทย) *Lotos* (บัวสาย) และสกุลย่อย *Nymphaea* (บัวฝรั่ง) (Slocum, 2005) ส่วนสกุล *Victoria* (บัววิกตอเรีย) รู้จักกันในนามบัวกระดัง ในสองสกุลนี้สามารถเรียกรวมๆกันว่า “อุบลชาติ (waterlily)” สำหรับบัวสกุล *Nelumbo* (บัวหลวง) เรียกว่า “ปทุมชาติ (lotus)”

โดยทั่วไปแล้วบัวสกุล *Nymphaea* ดอกจะบานประมาณ 3 วัน ลักษณะการบานของดอกจะเป็นลักษณะ บาน-หุบ ๆ โดยจะบานและหุบวันละ 1 ครั้ง รวม 3 ครั้ง โดยในแต่ละสกุลย่อยจะเริ่มบานในเวลาที่แตกต่างกัน จึงสามารถแบ่งบัวสกุลนี้ออกได้ 2 พวกคือ พวกบานกลางวัน ได้แก่ สกุลย่อย *Anecphyta*, *Brachyceras* และ *Nymphaea* จะมีระยะเวลาการบานอยู่ระหว่างเวลาประมาณ 06.00 น. – 14.00 น. ยกเว้นบัวพันธุ์จงกลณีที่บานตลอดทั้งวันทั้งคืน ส่วนพวกบานกลางคืน ได้แก่ สกุลย่อย *Hydrocallis* และ

Lotos จะเริ่มบานเวลาประมาณ 19.00 น. แล้วไปหุบประมาณ 10.00 น. ของวันถัดไป ตามที่นำเสนอแล้วว่า ดอกบัวเป็นแบบดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ โดยธรรมชาติของบัวสกุลนี้แล้วมีกลไกในการป้องกันการผสมตัวเองภายในดอกเดียวกัน (Vandaveer, 2003) กลไกนี้เรียกว่า Protogynous คือ การที่เกสรตัวเมียพร้อมรับการผสมละอองเกสรของดอกอื่น ก่อนที่เกสรตัวผู้ในดอกเดียวกันจะพร้อมแพร่กระจายละอองเกสร ดังนั้นในบัวสกุล *Nymphaea* เกสรตัวเมียพร้อมรับการผสมในวันแรกที่ดอกบาน ส่วนเกสรตัวผู้พร้อมกระจายละอองเกสรในวันที่สองและสาม แต่ทั้งนี้ก็มีข้อยกเว้นสำหรับบัวบางพันธุ์ ที่เกสรตัวผู้พร้อมผสมในวันแรกพร้อมกับเกสรตัวเมีย ซึ่งทำให้สามารถผสมกันได้ในดอกเดียวกัน

การผสมพันธุ์พืชส่วนใหญ่เป็นการผสมพันธุ์กันระหว่างพันธุ์ต่างๆภายในชนิด (species) เดียวกัน ลักษณะต่างๆของพืชจึงจำกัดอยู่ภายในกรอบของแต่ละชนิด แต่ความพยายามของมนุษย์ย่อมไม่มีที่สิ้นสุด ประกอบกับความอยากรู้อยากเห็น และอยากให้ได้พืชที่มีลักษณะแปลกๆใหม่ๆ ซึ่งธรรมชาติมิได้สร้างไว้ให้ นักผสมพันธุ์จึงต้องพยายามเสาะแสวงหาลักษณะจากพืชที่ต้องการชนิดหนึ่ง เพื่อนำไปใส่ให้กับพืชอีกชนิดหนึ่ง (กฤษฎา, 2528) สำหรับการผสมพันธุ์บัวในสกุล *Nymphaea* นั้น เป็นการผสมพันธุ์ภายในสกุลย่อยเดียวกัน ซึ่งในกลุ่ม *Syncarpiae* ประกอบด้วย 3 สกุลย่อยตามที่ได้นำเสนอไปแล้ว ปรากฏว่าบัวในกลุ่มนี้ให้ดอกที่มีสีจำกัดอยู่เพียงไม่กี่สี และไม่มีบัวชนิดใดเลยในทั้ง

3 สกุลย่อยที่ให้ดอกกลุ่มสีน้ำเงิน แต่บัวในกลุ่ม *Apocarpiae* กลับเป็นบัวที่ให้ดอกมีสีหลากหลายรวมทั้งมีสีน้ำเงิน ซึ่งมีทั้งในสกุลย่อย *Anecphyta* และ *Anecphyta* ดังนั้นนักผสมพันธุ์บัวที่นิยมความแปลกใหม่ จึงพยายามที่จะนำลักษณะเด่นในบัวชนิดหนึ่งไปใส่ให้กับบัวอีกชนิดหนึ่ง เช่น ผสมพันธุ์บัวฝรั่งให้มีดอกเป็นสีน้ำเงินหรือสีอื่นๆที่ไม่มีในบัวฝรั่ง หรือผสมพันธุ์บัวสายให้ได้ดอกสีเหลือง หรือผสมพันธุ์บัวที่มีดอกบานตลอดทั้งวันเหมือนกับบัวจงกลนี เป็นต้น

ในอดีตที่ผ่านมา นักผสมพันธุ์บัว (*Nymphaea* spp.) ได้ทำการผสมพันธุ์บัวข้ามสกุลย่อย เพื่อหวังผลให้เกิดลูกผสมที่มีลักษณะของบัวฝรั่งแต่มีดอกเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งมักเรียกกันในวงการบัวว่า “Blue hardy waterlily (บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงิน)” นั้น นับเป็นความใฝ่ฝันของนักปรับปรุงพันธุ์บัวจากทั่วโลก มีหลักฐานที่บันทึกไว้แสดงให้เห็นว่า ได้มีความพยายามในการผสมพันธุ์บัวให้ได้บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงินมานานกว่า 100 ปีแล้ว Latour-Marliac (1893, 1899) ได้ทำการผสมพันธุ์ระหว่างบัวฝรั่งกับบัวผัน เพื่อให้ได้ลูกผสมบัวฝรั่งดอกสีน้ำเงิน แต่ก็ต้องผิดหวังที่ไม่สำเร็จ Reditt (1989) รายงานว่า Andreas Protopapas วิศวกรผู้หลงใหลในการผสมพันธุ์บัวที่มีชื่อเสียงของไซปรัส ได้อุทิศตัวในความพยายามผลิตบัวฝรั่งดอกสีน้ำเงินเพื่อให้ได้เป็นต้นแรกของโลก ซึ่ง ณ ปัจจุบันนี้เขาก็ยังพยายามอยู่ ส่วน Nash (1996) รายงานว่า Perry D. Slocum นักผสมพันธุ์บัวและไม้ดอกไม้ประดับที่มีชื่อเสียงของสหรัฐอเมริกา ได้ทำการผสมพันธุ์บัว

โดยมุ่งเน้นผลิตบัวฝรั่งดอกสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นสิ่งที่ปรารถนามากที่สุด และสิ่งที่ท้าทายอย่างยิ่งคือความสำเร็จในการผสมข้ามระหว่างบัวฝรั่งกับบัวเขตร้อนที่มีจำนวนโครโมโซมต่างกันให้ได้บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงิน Speichert และคณะ (2004) เสนอว่าปัจจุบันมีเพียงโทนสีน้ำเงินและม่วงเท่านั้นที่ไม่พบในบัวฝรั่ง จากความพยายามของนักผสมพันธุ์บัวดังกล่าว แม้เวลาจะล่วงเลยมานานกว่า 100 ปี นักผสมพันธุ์บัวรุ่นใหม่ยังคงใฝ่ฝันและเพียรพยายามเพื่อผลิตบัวฝรั่งดอกสีน้ำเงินต่อไป สำหรับการศึกษานี้เป็นการศึกษาผสมพันธุ์ข้ามสกุลย่อย เพื่อให้ได้บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงิน เช่นเดียวกับความฝันของนักผสมพันธุ์บัวในอดีต

อุปกรณ์และวิธีการ

นำบัวสกุลย่อย *Nymphaea* มาใช้ คัดเลือกจากต้นที่มีประวัติการติดฝักง่าย ดอกสวยงาม และให้ดอกดกเป็นเกณฑ์ จำนวน 5 พันธุ์เป็นต้นแม่ ส่วนต้นที่จะนำมาใช้เป็นต้นพ่อ ใช้พันธุ์ใน 2 สกุลย่อยคือ *Anecphyta* และ *Brachyceras* โดยเลือกเฉพาะต้นที่ให้ดอกในกลุ่มสีน้ำเงิน ทั้งนี้เพื่อหวังผลจากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของสีน้ำเงินจากต้นพ่อไปสู่รุ่นลูก ได้คัดเลือกพันธุ์จาก *Anecphyta* จำนวน 2 พันธุ์ และ *Brachyceras* จำนวน 20 พันธุ์ ดำเนินการผสมพันธุ์ด้วยวิธีการปกติ (conventional breeding) และไม่ได้ทำการผสมแบบสลัฟพ่อสลัฟแม่ (reciprocal cross) โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์ดังนี้

1. นำถุงผ้าแพรคลูมดอก 1 วัน ก่อนใช้

ในการผสมพันธุ์

2. เลือกต้นแม่ โดยพิจารณาจากดอกบานวันแรกของบัวสกุลย่อย *Nymphaea* ใช้เป็นต้นแม่ซึ่งดอกบานวันแรก สังเกตได้จากส่วนกลางของดอกจะมีน้ำหวาน (nectar) อยู่ในแอ่งน้ำหวานของเกสรตัวเมีย (stigmatic disc) สำหรับเกสรตัวผู้บนดอกของต้นแม่ที่จะใช้ผสม ไม่จำเป็นต้องตัดดอก เพราะในบัวฝรั่งเกสรตัวผู้ยังไม่พร้อมผสมในวันแรก เนื่องจากกลไก protogynous ของพืช

3. เลือกต้นพ่อ ที่ดอกบานวันที่ 2 หรือ 3 ของบัวสกุลย่อย *Anecphyra* หรือ *Brachyceras* เป็นพ่อ โดยอับเรณูจะเปิดออกเพื่อแพร่กระจายเรณู เวลาที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์จะอยู่ในช่วงเวลา ประมาณ 8.00 – 10.00 น.

4. ตัดอับเรณูใส่ช้อน โดยจะสังเกตเห็นว่ามีละอองเรณูสีเหลืองอยู่

5. เทอับเรณูลงในแอ่งน้ำหวาน และใช้พู่กันกววนเบาๆ เพื่อให้ละอองเกสรกระจายได้ทั่ว

6. คลุมดอกด้วยถุงผ้าแพร และผูกเชือกปิดปากถุง

7. ติดป้ายชื่อรายละเอียดการผสม พร้อมผูกติดกับก้านดอก

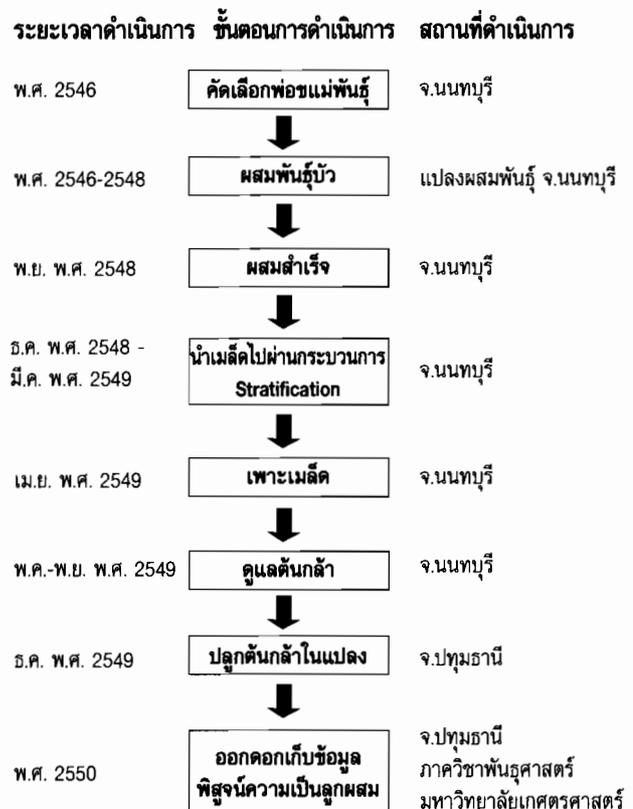
8. หลังจากวันที่ 5 ของการบาน ดอกจะเริ่มโน้มลงและจมลงใต้น้ำ ทิ้งไว้สัก 2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้าดอกเน่าแสดงว่าผสมไม่ติด แต่ถ้าดอกไม่เน่า กลีบเลี้ยงและกลีบดอกยังคงอยู่ รังไข่จะขยายตัวใหญ่ขึ้นเป็นฝัก (pod)

9. ประมาณ 3 – 4 สัปดาห์หลังการผสม ฝักจะแก่ และแตกให้เมล็ดออกมา ซึ่งเมล็ดจะถูก

ห่อหุ้มด้วยเจลาติน (โดยธรรมชาติแล้วถุงเจลาตินจะทำให้เมล็ดลอยไปได้ไกลๆตามกระแส น้ำ และกระแสลมที่จะพาไป) นำเมล็ดที่อยู่ในถุงผ้าแพรมาแช่ในภาชนะประมาณ 2 วัน เจลาตินจะเริ่มเปื่อย ล้างเจลาติน เศษของฝัก และเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์ออกให้หมด เหลือเฉพาะเมล็ดที่สมบูรณ์

10. นำเมล็ดที่ได้ใส่แช่ในภาชนะขนาดเล็ก นำไปผ่านกระบวนการ stratification โดยเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 4-5°C. อย่างน้อย 2 เดือน เพื่อทำลายการพักตัวของเมล็ด แล้วนำออกมาเพาะ

ระยะเวลาดำเนินการปี พ.ศ. 2546 – 2550 ใน จ. นนทบุรี ปทุมธานีและกรุงเทพฯ โดยมีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้



ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาใช้พันธุ์บัวสกุลย่อย *Nymphaea* ผสมกับ *Anecphya* ไม่ประสบความสำเร็จ อาจเนื่องมาจากคู่ผสมมีจำนวนโครโมโซมที่ต่างกันมาก คือ จำนวนโครโมโซม โดยทั่วไป $2n = 2x = 28$ แต่สำหรับจำนวนโครโมโซมของบัวในสกุลย่อย *Anecphya* $2n = 16x = 224$ (Pagels, 2000) จึงยากต่อการติดฝัก แต่ในการผสมพันธุ์บัวสกุลย่อย *Nymphaea* กับ *Brachyceras* มีอยู่ 1 คู่ผสมที่สามารถติดฝัก ได้เมล็ดจำนวน 244 เมล็ด เมื่อนำไปเพาะสามารถงอกเป็นต้นอ่อนได้จำนวน 39 ต้น ในจำนวนนี้เจริญเติบโตเป็นต้นกล้าที่แข็งแรงจนออกดอกได้ 20 ต้น (สายพันธุ์) ใน 20 สายพันธุ์นี้มีลักษณะต่างๆ ที่น่าสนใจในแต่ละส่วนของพืช ดังนี้

1. ดอก

การใช้สกุลย่อย *Nymphaea* เป็นแม่ซึ่งมีดอกสีชมพู และใช้สกุลย่อย *Brachyceras* เป็นพ่อดอกสีม่วง-น้ำเงิน ลูกผสมที่ได้ดังแสดงใน Figure 1 สามารถจำแนกสีดอกออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มสีชมพู มีจำนวน 17 สายพันธุ์ ลูกผสมที่ได้มีตั้งแต่สีชมพูอ่อนไปจนถึงสีชมพูเข้ม แต่มีที่น่าสังเกตในหลายต้นของกลุ่มนี้คือ ต้นที่มีดอกบานวันแรกเป็นสีชมพูอ่อน พอวันที่ 2 หรือ 3 กลีบดอกและกลีบเลี้ยงสีจะจางลงจนเกือบเป็นสีขาว แต่ปลายกลีบกลับกลายเป็นสีชมพูที่เข้มขึ้น ได้แก่ ลูกผสมหมายเลข 4, 8, 12 และ 14 สำหรับดอกที่มีสีชมพูเข้มจะสังเกตเห็นว่าส่วนใหญ่บริเวณโคนกลีบดอกจะมีสีที่อ่อนกว่าส่วนอื่นของกลีบ

ได้แก่ ลูกผสมหมายเลข 1 2 9 10 15 19 และ 20 ซึ่งทั้ง 2 ลักษณะนี้ไม่มีใครพบในดอกของสกุลย่อย *Nymphaea* แต่จะพบใน *Brachyceras* ส่วนลูกผสมที่เหลืองกลีบดอกจะมีสีแบบสม่ำเสมอ

กลุ่มสีน้ำเงิน มีจำนวน 3 สายพันธุ์ ซึ่งลูกผสมที่ได้จะมีสีไปทางพ่อคือ สีม่วง-น้ำเงิน และสีบริเวณตรงโคนกลีบดอกจะมีสีที่อ่อนกว่าส่วนอื่น ได้แก่ ลูกผสมหมายเลข 3 16 และ 18 ทำให้ประสบความสำเร็จ ได้ลูกผสมในกลุ่มสีน้ำเงิน

ลักษณะสีบริเวณส่วนปลายของอับเกสรตัวผู้เป็นลักษณะที่ลูกผสมทั้งหมดได้รับจากพ่อโดยจะมีสีตามสีของกลีบดอก สำหรับการออกดอกของลูกผสม ส่วนมากออกดอกง่าย เช่นเดียวกับทั้งพ่อและแม่ และให้ดอกดกตามแบบฉบับของบัวพันธุ์ (พ่อ) แต่ก็มีลูกผสมจำนวนน้อยที่ออกดอกยาก

2. คาร์เพล (Carpel)

การตัดตามขวางรังไข่ของดอกบัวโดยใช้ใบมีดโกน พบว่าภายในรังไข่ประกอบด้วยหลายคาร์เพล (คล้ายผลล้มตัดตามขวาง) ในแต่ละคาร์เพลที่อยู่ติดกันผนังของคาร์เพลเชื่อมติดกัน ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า "Syncarpous" แต่ถ้าผนังของคาร์เพลแยกจากกันได้โดยอิสระ เรียกลักษณะนี้ว่า "Apocarpous" ผนังของคาร์เพลเป็นลักษณะสำคัญที่นักพฤกษศาสตร์ใช้ในการแบ่งบัวสกุล *Nymphaea* ออกเป็น 2 กลุ่ม (Conard, 1905) ดังนี้คือ กลุ่ม Apocarpiae ประกอบด้วย 2 สกุลย่อย ได้แก่ *Anecphya* และ *Brachyceras* และกลุ่ม Syncarpiae ประกอบด้วย

3 สกุลย่อย ได้แก่ *Hydrocallis*, *Lotos* และ *Nymphaea*

ผลจากการตัดตามขวางรังไข่ของดอกบัว ลูกผสมทั้ง 20 สายพันธุ์ พบว่าลูกผสมทั้งหมดมีผนังแบบ Syncarpous แสดงว่าลูกผสมได้รับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากแม่ (สกุลย่อย *Nymphaea*) ซึ่งอยู่ใน กลุ่ม Syncarpiae

3. ใบ

ลักษณะของขอบใบของบัวฝรั่ง (*hardy waterlily*) จะมีขอบใบเป็นแบบ (เรียบ) entire ส่วนบัวผัน (*tropical waterlily*) จะมีขอบใบเป็นแบบ (ซี่ฟัน) dentate ลูกผสมทุกสายพันธุ์มีขอบใบแบบเรียบสำหรับลักษณะใบมีจุดประ (flecked) ลูกผสม 13 สายพันธุ์ใบมีจุดประแบบพ้อ ที่เหลือ 7 สายพันธุ์มีใบเป็นสีเขียวพื้น (plain green) แบบแม่ ในส่วนของ ก้านใบ (petiole) และ ก้านดอก (peduncle) ลูกผสมทุกสายพันธุ์มีขน (pubescent) ที่ก้านใบและก้านดอก เช่นเดียวกับแม่

4. ลำต้นใต้ดิน

ลำต้นใต้ดิน ของ ลูกผสมทั้งหมดมีลักษณะการเจริญในแนวนอน (horizontal) โดยมีลำต้นแบบเหง้า (rhizome) ซึ่งได้รับอิทธิพลจากแม่ ส่วนลำต้นใต้ดินของพ้อมีการเจริญในแนวตั้ง (vertical) โดยมีลำต้นแบบไหล (tuber) สำหรับระบบราก ลูกผสมส่วนใหญ่ได้รับอิทธิพลจากพ้อ โดยรากจำนวนมาก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการหาอาหารและการยึดเกาะกับดิน

5. การพิสูจน์ความเป็นลูกผสม (Hybridity)

คัดเลือกลูกผสมที่มีดอกสวยงามจากกลุ่มสีชมพู 3 แบบ (แบบที่ปลายกลีบกลายเป็นสีชมพูที่เข้มขึ้น แบบบริเวณโคนกลีบดอกจะมีสีที่อ่อน และสีสม่ำเสมอ) แบบละ 1 สายพันธุ์ และจากกลุ่มสีน้ำเงิน 1 สายพันธุ์ รวมเป็น 4 สายพันธุ์ พร้อมพ่อและแม่ นำไปตรวจสอบองค์ประกอบเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology marker) สามารถพิสูจน์ได้ดังนี้

5.1 การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล คือการใช้ดีเอ็นเอ (DNA) มาเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างในระดับของยีนหรือดีเอ็นเอ ในพืชที่ได้ทำการศึกษา ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะมากกว่าการตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยการสกัดดีเอ็นเอจากกลีบดอกของพ้อแม่และลูกผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก molecular biology laboratory protocols (<http://www.cipotato.org/training/Materials/Molecular/Molecular.asp>) สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลประเภท Co-dominant marker ชนิด PCR-RFLP marker ที่จำเพาะกับบริเวณ ITS (internally transcribed spacer) ของยีน nrRNA (nuclear ribosomal RNA) โดยใช้ไพรเมอร์ที่บริเวณอนุรักษ์ในยีน 18S และ 26S (Primer F : 5'- TCGCTCCTACCGATTGAATG -3' และ



Figure 1. Diagram of flowers of F1 Hybrids of subgenus *Nymphaea* x subgenus *Brachyceras*

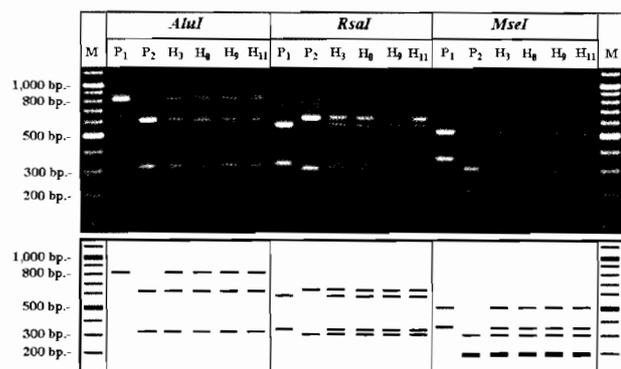
Primer R : 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') และปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ 1 รอบของ 94 °ซ. นาน 3 นาที 35 รอบที่ 94 °ซ. 30 วินาที 59 °ซ. 1 นาที 72 °ซ. 2 นาที และ 1 รอบที่ 72 °ซ. 5 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่ 4 °ซ. ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ขนาดประมาณ 870 คู่เบสถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ AluI, RsaI และ MseI ก่อนนำไปตรวจสอบโดย 1% agarose gel electrophoresis (Figure 2) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ พ่อและแม่มีรูปแบบของลำดับเบสหรือแอลลีลที่แตกต่างกัน ทั้งพ่อและแม่มีสภาพของแอลลีลเป็นฮอโมไซโกต (homozygote) ซึ่งแอลลีลจากพ่อ 1 แอลลีล และแอลลีลจากแม่ 1 แอลลีล พบรวมอยู่ในลูกผสมที่ได้ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า ลูกผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นลูกผสมของพ่อ-แม่คู่นี้จริง

5.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏในสายพันธุ์ที่ได้จากลูกผสม เปรียบเทียบกับลักษณะที่ปรากฏในพ่อและแม่ สามารถยืนยันได้ว่าลูกผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ และที่เหลือที่มีได้แสดงไว้มีความเป็นลูกผสมจริง ตามลักษณะของพ่อ แม่ และลูกผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ (Figure 1) แสดงว่าลูกผสมสามารถรับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมมาจากทั้งแม่ (*Nymphaea*) และพ่อ (*Brachyceras*) โดยลูกผสมมีทั้งสีชมพู และสีม่วง-น้ำเงิน ลูกผสมทั้งหมดมีดอกชูเหนือน้ำซึ่งได้รับลักษณะจาก *Brachyceras* ลูกผสมมีคาร์เพลเป็นแบบ Syncarpous ซึ่งผนังของแต่ละคาร์

เพลจะเชื่อมติดกันเป็นลักษณะของ *Nymphaea* อีกทั้งลักษณะของใบยังได้ลักษณะขอบใบเรียบจาก *Nymphaea* แต่ลูกผสมส่วนใหญ่ได้ลักษณะใบมีจุดประจาก *Brachyceras* ส่วนน้อยได้ลักษณะใบมีสีเขียวพื้นจาก *Nymphaea* นอกจากนี้ลูกผสมทั้งหมดยังรับลักษณะการเจริญเติบโตของลำต้นใต้ดินแบบ rhizome จาก *Nymphaea* โดยมีนิสัยการเจริญในแนวอน

สำหรับลูกผสมกลุ่มดอกสีน้ำเงิน ลักษณะดอกส่วนใหญ่ได้รับการถ่ายทอดจาก *Brachyceras* ได้แก่ สีดอกและดอกชูเหนือน้ำ แต่ลักษณะของคาร์เพลเป็นแบบ Syncarpous ซึ่งเป็นลักษณะ



- P₁ = subgenus *Nymphaea*
- P₂ = subgenus *Brachyceras*
- M = DNA ladder
- H₃ = *N.* 'Siam Blue Hardy'
- H₈ = *N.* 'Siam Pink Tips'
- H₉ = *N.* 'Siam Pink'
- H₁₁ = unnamed hybrid

Figure 2. DNA fingerprints of the parents and hybrids based on PCR-RFLP technique of ITS sequence

Characteristics	Pod parent * (Subgenus <i>Nymphaea</i>)	Hybrid (H3) (N. 'Siam Blue Hardy')	Hybrid (H8) (N. 'Siam Pink Tips')	Hybrid (H9) (N. 'Siam Pink')	Hybrid (H11) (Unnamed hybrid)	Pollen parent * (Subgenus <i>Brachyceras</i>)
Flower						
Colour	Pink	Purple/blue	Pale pink with pink tips	Pink	Pink	Purple/blue
Position	Surface of the water	Above the water	Above the water	Above the water	Above the water	Above the water
Shape	Cupped	Cupped	Cupped	Cupped	Cupped	Cupped
Ovary						
Carpel	Syncarpous	Syncarpous	Syncarpous	Syncarpous	Syncarpous	Apocarpous
Pad						
Edge	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire	Dentate
Colour	Plain green	Flecked	Flecked	Flecked	Plain green	Flecked
Rootstock						
Growth habit	Horizontal growth	Horizontal growth	Horizontal growth	Horizontal growth	Horizontal growth	Vertical growth

* The names of the parents of these hybrids will be disclosed at the appropriate time.

Figure 3. The characteristics of the parents and offspring

ของ *Nymphaea* รวมทั้งลักษณะขอบใบเรียบได้ จาก *Nymphaea* ส่วนลักษณะใบมีจุดประได้รับ จาก *Brachyceras* สำหรับลักษณะการเจริญเติบโตของลำต้นใต้ดินเจริญในแนวนอนเป็นลักษณะของ *Nymphaea*

6. ลูกผสมข้ามสกุลย่อย

การผสมพันธุ์ข้ามสกุลย่อยของบัวยากที่จะประสบความสำเร็จ ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนโครโมโซมในแต่ละสกุลย่อยแตกต่างกันทำให้ยากต่อการติดฝัก แต่ในความยากนี้ก็ยังมีบางคู่ผสมที่สามารถผสมพันธุ์จนติดฝักและให้ลูกผสมได้

การผสมระหว่างบัวต่างสกุลย่อยได้มีรายงานมาบ้างแล้วโดย Doran และคณะ (2004) และ Les และคณะ (2004) แต่เป็นการผสมระหว่างสกุลย่อย *Anecphyta* กับ *Brachyceras* ซึ่งทั้งคู่อยู่ในกลุ่ม Apocarpiae แต่การศึกษานี้เป็นการผสมระหว่าง สกุลย่อย *Nymphaea* กับ *Brachyceras* ซึ่งต่างกลุ่มกันคือ กลุ่ม Syncarpiae และ Apocarpiae ตามลำดับ ผลการตรวจสอบลูกผสม 4 สายพันธุ์ ทั้งวิธีการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 2 วิธี ได้ข้อมูลตรงกันว่าลูกผสมดังกล่าวเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามของบัวสกุลย่อยจริง สำหรับลูกผสมอีก 16 สายพันธุ์ ที่ไม่ได้รับการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล แต่ทั้งหมดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องในทำนองเดียวกันกับลูกผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังนั้นสามารถเชื่อในระดับหนึ่งได้ว่า มี

ความเป็นไปได้สูงที่ลูกผสมทั้ง 16 สายพันธุ์ เป็นลูกผสมข้ามสกุลย่อยจริง

7. ทำไมจึงพิจารณาว่าลูกผสมเป็นบัวฝรั่ง

เนื่องจากลูกผสมเกิดจากการผสมเกสรระหว่างสกุลย่อย *Nymphaea* กับ *Brachyceras* ดังนั้นชื่อที่ควรกล่าวอ้างถึงควรจะเป็นทั้งบัวฝรั่งและบัวผัน อย่างไรก็ตามลูกผสมมีลักษณะเฉพาะที่สำคัญส่วนใหญ่ของบัวฝรั่ง แต่มีดอกชูเหนือน้ำแบบบัวผัน ซึ่งสนับสนุนว่าลูกผสมเป็นบัวฝรั่ง (Table 1)

ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกว่าเป็นบัวฝรั่งก็คือ ผนังของคาร์เพลจะเชื่อมติดกันแบบ Syncarpous มีขอบใบเรียบ และมีลำต้นใต้ดินเป็น

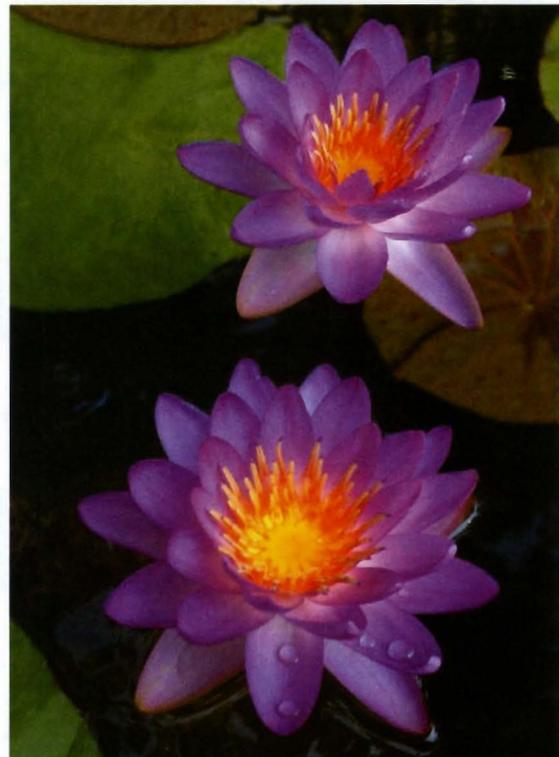


Figure 4. Flowers of *Nymphaea* 'Siam Blue Hardy'

Table 1. Comparison of the differences between hardy, tropical day blooming waterlilies and hybrids (Adapted from Knotts, (2003)

Characteristics	Hardy waterlilies (subgenus <i>Nymphaea</i>)	Tropical day blooming waterlilies (subgenus <i>Brachyceras</i>)	Hybrids
Flowers	Colours include white, all shades of pink, red, yellow and changeable autumn. Many, though not all, float on the surface of the water and many are cup-shaped with some starry.	Colours include white, all shades of pink, red, yellow, autumn, blue, purple and undertones of green. All stand above the water and shapes are usually starry but some varieties are more cupped.	Seventeen pink shades and 3 purple/blue. All stand above the water and have starry and cup-shaped.
Carpels	A characteristic of all hardy waterlily is that the carpels share a single common wall between adjacent carpels. This is called "Syncarpous". (Conard, 1905)	A characteristic of all tropical day flowering waterlily is that each carpel has its own wall which separates it from the adjacent carpels. This is called "Apocarpous". (Conard, 1905)	All hybrids have the carpels share a single common wall, syncarpous type.
Pads	Hardy pads are rather thick and leathery with smooth edges. Most are plain green though many are lightly mottled with maroon when young. An exception is N. 'Arc-en-ciel' which is green, pink and maroon.	Tropical pads are usually somewhat thin with edges slightly scalloped or toothy. They can be plain green, flecked, mottled or whorled with maroon or bronze.	All hybrid pads have the smooth edges. Thirteen hybrids are flecked, 7 pads are plain green.
Growth habit	Hardies grow horizontally from and along a fleshy rhizomatous rootstock. "Eyes" at points along the rhizome produce new crowns.	Tropicals grow from a single central crown. All leaves and flowers radiate from this point and growth is vertical.	All hybrids grow horizontally from and along a fleshy rhizomatous rootstock.

แบบ rhizome ที่เจริญเติบโตไปในแนวนอน ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่ใช้ตัดสินว่าบัวนั้นเป็นบัวฝรั่งหรือบัวผันก็คือ 3 ลักษณะดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าลูกผสมข้ามสกุลย่อยนี้ มีคุณลักษณะสำคัญทั้ง 3 ประการดังกล่าว จึงสามารถตัดสินได้ว่าลูกผสมนี้เป็นบัวฝรั่งจริง (Table 1)

ตามที่ได้เสนอแล้วว่า สีดอกของลูกผสมจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มสีชมพูมีจำนวน 17 สายพันธุ์ ซึ่งในกลุ่มนี้ให้ดอกที่มีความสวยงามในรูปทรงดอก รูปแบบของสีและระดับของสีชมพูที่แตกต่างออกไป และกลุ่มสีน้ำเงินมีจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ลูกผสมหมายเลข 3 16 และ 18 แสดงไว้ใน Figure 1 ซึ่งลูกผสมในกลุ่มนี้ถือได้ว่าเป็นลูกผสมที่มี “สีใหม่” ที่ยังไม่เคยปรากฏมาก่อนในบัวฝรั่ง จึงสามารถอ้างสิทธิ์ได้ว่า ลูกผสมชุดนี้เป็นบัวฝรั่งดอกสีน้ำเงินชุดแรกของโลก ซึ่งทั้งหมดมีดอกสีม่วง-น้ำเงิน แต่มีเพียงสายพันธุ์เดียวคือ ลูกผสมหมายเลข 3 ที่มีรูปทรงดอกสวยงามและมีจำนวนกลีบดอกมากกว่า สมควรที่จะได้รับการตั้งชื่อว่าลูกผสมสายพันธุ์เป็น “บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงินต้นแรกของโลก” ซึ่งได้รับการสร้างสรรค์ขึ้นในประเทศไทย ในปีพ.ศ.2550 เพื่อเป็นเกียรติแด่ถิ่นกำเนิดของลูกผสมนี้ จึงตั้งชื่อว่า *Nymphaea* ‘Siam Blue Hardy’ (Figure 4)

สิ่งที่ต้องดำเนินการต่อไปคือ ผสมพันธุ์จากคู่ผสมที่ประสบความสำเร็จเพิ่มเติม และทำการผสมแบบสลับพ่อสลับแม่ เพื่อคัดเลือกบัวฝรั่งสีน้ำเงินจากต้นที่มีดอกเป็นสีน้ำเงินมากที่สุด และดอกมีกลีบดอกไม่น้อยกว่า 40 กลีบ ตลอดจนหาคู่ผสมใหม่ๆ เพื่อให้ได้ลูกผสมที่แตกต่างกันออกไป

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้มีเป้าหมายเดียวกันคือการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงิน จึงนำบัวสกุลย่อย *Nymphaea* เป็นแม่ ผสมกับสกุลย่อย *Anecphyra* และ *Brachyceras* เป็นพ่อเพื่อหวังผลจากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของสีน้ำเงินไปสู่รุ่นลูก การศึกษาประสบผลสำเร็จเมื่อ *Nymphaea* กับ *Brachyceras* คู่หนึ่งสามารถติดฝักให้ลูกผสมที่มีดอกในกลุ่มสีชมพู และกลุ่มสีน้ำเงิน ได้รับการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมว่าเป็นลูกผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย *Nymphaea* กับ *Brachyceras* จริง ด้วยการตรวจสอบองค์ประกอบเครื่องหมายโมเลกุล และลักษณะทางสัณฐานวิทยา และยังได้พิสูจน์ว่าลูกผสมมีลักษณะที่สำคัญส่วนใหญ่เป็นของบัวฝรั่ง ดังนั้นจากการที่ลูกผสมให้ดอกสีม่วง-น้ำเงิน ถือได้ว่าเป็นสีใหม่ ที่ยังไม่เคยปรากฏมาก่อนในบัวฝรั่ง ลูกผสมนี้จึงเป็น “บัวฝรั่งดอกสีน้ำเงินลูกผสมต้นแรกของโลก” ซึ่งได้รับการตั้งชื่อว่า *Nymphaea* ‘Siam Blue Hardy’

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.เสริมลาภ วสุวัต ที่ถ่ายทอดความรู้เรื่องบัว สนับสนุนพันธุ์บัวในการศึกษา ตรวจสอบแก้ไขผลงาน และคุณวิโรจน์ หิรัญยุปกรณ์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการปลูกลูกผสม คุณปริมลาภ (วสุวัต) ชูเกียรติมั่น สำหรับการเอื้อเฟื้อเกสรบัวในการผสมพันธุ์และสถานที่ในการปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ Mrs. Kit Knotts ผู้บริหารเว็บไซต์ www.victoria-adventure.org ซึ่ง

เป็นแหล่งข้อมูลบัวที่ผู้วิจัยได้รับความรู้และเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษา โดยให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดจน ผศ.ดร. ณ นพชัย ชาญศิลป์ ที่ให้คำปรึกษายามมีปัญหาเรื่องการผสมพันธุ์บัวและเพาะเมล็ด พร้อมทั้ง ผศ.ดร.ยงยุทธ เจียมไชยศรี ให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขปัญหारेื่องการกำจัดตระไคร้หน้า คุณพิเชษฐ พร้อมมูล สำหรับการช่วยปลักต้นผลงานและให้คำแนะนำในการเขียนผลงานจนสำเร็จ สุดท้ายขอขอบคุณคุณกันตภณ พร้อมมูล ที่ช่วยแปลบทความ และท่านอื่นๆ ที่ให้ความช่วยเหลือซึ่งมิได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2528. *ปรับปรุงพันธุ์พืช*. บริษัทสำนักพิมพ์ไทยวิวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ. 155 หน้า.
- Anon. 2008a. *Family Nelumbonaceae*, Germplasm Resources Information Network, GRIN Taxonomy for Plants. www.ars-grin.gov, 17/02/2008.
- Anon. 2008b. *Genera of Nymphaeaceae*, Germplasm Resources Information Network, GRIN Taxonomy for Plants. www.ars-grin.gov, 17/02/2008.
- Conard, H.S. 1905. The Waterlilies, Pages 86-87,126. *In: A Monograph of the Genus Nymphaea*. The Carnegie Institute of Washington. Washington D.C.
- Doran, A.S., D.H. Les and M.L. Moody. 2004. *Nymphaea* 'William Phillips', a new intersubgeneric hybrid. *HortScience* 39(2): 446-447.
- Knotts, K. 2003. *How Do You Tell the Difference between Tropical and Hardy Waterlilies?*. www.victoriaadventure.org, 02/03/2003.
- Latour-Marliac, J.B. 1893. The New Hardy Water Lilies. *The Garden* 12(23): 582-584.
- Latour-Marliac, J.B. 1899. *Hardy Hybrid Water Lilies*. *The Garden* 3(18). www.victoria-adventure.org, 20/04/2003.
- Les, D.H., M.L. Moody and A.S. Doran. 2004. A genetically confirmed inter-subgeneric hybrid in *Nymphaea* L. (*Nymphaeaceae* Salisb.). *HortScience* 39(2): 219-222.
- Nash, H. 1996. *Perry D. Slocum: An American Legacy*. Water Gardening. www.victoria-adventure.org, 20/04/2003.
- Pagels, W. 2000. *Chromosome Counts of Waterlilies and Other Nymphaeaceae*. www.victoria-adventure.org, 25/05/2003.
- Reditt, J. 1989. *The Quest for the Hardy Blue*. Cyprus Weekly. Christmas Edition 1989. www.victoria-adventure.org, 20/04/2003.
- Slocum, P.D. 2005. *Waterlilies and Lotuses: Species Cultivars and New Hybrids*. Timber Press, Inc. Portland, Oregon, U.S.A. 260p.
- Speichert, G. and S. Speichert. 2004. *Encyclopedia of Water Garden Plants*. Timber Press, Inc. Portland, Oregon, U.S.A. 388 p.
- Vandaveer, C. 2003. *How does this waterlily protect its seeds?*. www.killerplants.com, 15/09/2003.