ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Passiflora* spp.

(ภาษาอังกฤษ) Genetic diversity in *Passiflora* spp.

แหล่งเงิน เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2554

จำนวนเงิน 50,000 บาท

ระยะเวลา ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2553 - 30 กันยายน 2554

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail kpanurug@kmitl.ac.th

คำสำคัญ: สกุล *Passiflora*, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Keywords: *Passiflora* spp., genetic diversity

บทคัดย่อ

พืชสกุล *Passiflora* เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างมาก ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* โดยศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาในส่วนของใบ และเทคนิคทางโมเลกุล จากพืชสกุล *Passiflora* ที่รวบรวมจากต่างประเทศมาไว้ที่แปลงทดลองส่วนพระองค์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี จำนวน 17 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ในประเทศจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ กะทกรก (*P. foetida*) และเสาวรส (*P. edulis* var. *flavicarpa*) รวมเป็น 19 ตัวอย่าง พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาในส่วนของใบมีความแตกต่างกัน สามารถแบ่งกลุ่มตามรูปร่างของใบ ทั้งขอบใบ ปลายใบ และโคนใบ ออกเป็น 4 กลุ่ม สำหรับเทคนิคทางโมเลกุล ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ที่อยู่บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ด้วยคู่ไพร์เมอร์ ITS1 Passiflora และไพรเมอร์ ITS2 Passiflora พบว่าทุกตัวอย่างมีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 650 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมกับตัวอย่างที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalX และ PHYLIP เพื่อหาแผนภูมิความสัมพันธ์โดยวิธี Neighbour-Joining แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในระดับสปีชีส์สูง สามารถจำแนกความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ทั้ง 19 ตัวอย่าง ออกได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบ โดย *P. edulis* และ *P. foetida* รวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

RCH
QK
495
.P28
Q199g

เลขหมู่ 131180

เลขทะเบียน

วัน,เดือน,ปี 22 พ.ค. 2557

.b 12601986

.i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Passiflora spp. is an economically important genus that shows great phenotypic variation. The objective of this work was to determine the diversity of *Passiflora* spp. based on the morphology of the leaves and molecular techniques. Seventeen species of *Passiflora* were collected from different countries in agriculture experiments of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, at the Sapathum palace, Pathumthani Province. Including, Ka-thok-rok (*P. foetida*) and Saowarot (passion fruit: *P. edulis* var. Flavicarpa) are found in Thailand. The *Passiflora* spp. shows a wide range of variation in their leaf morphology which was divided into 4 groups according to the shape of the leaf (shapes margins, apices and bases). For molecular technique, genetic diversity were investigated by PCR and nucleotide sequencing technique based on the internal transcribed spacers (ITS) regions of ribosomal DNA (rDNA) using the ITS1/ ITS2 Passiflora specific primers. The PCR amplification of this region was detected a unique fragment of approximately 650 bp. Nineteen sequences were aligned using the ClustalX program and compared with public sequences available in the GenBank database. The nucleotide sequences were analyzed against those of sequences using the PHYLIP software for phylogenetic analysis. The neighbour-joining dendrogram was generated which provided more information on polymorphism. *Passiflora* spp. was revealed a very high genetic diversity. In the construction of phylogenetic trees from DNA sequence data show four distinct divisions corresponding with leaf shape. It was found that *P. edulis* and *P. foetida* are in the same group.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2554 และขอขอบคุณ อาจารย์ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ จากแปลงทดลองส่วนพระองค์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี รวมทั้งสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	7
3.1 วัสดุ อุปกรณ์	7
3.1.1 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ	7
3.1.2 วัสดุ และสารเคมี	8
3.2 วิธีการทดลอง	8
3.2.1 การเก็บตัวอย่าง	8
3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ	8
3.2.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ	9
3.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	11
3.2.5 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	12
บทที่ 4 ผล และอภิปรายผลการทดลอง	
4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง	13
4.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	13
4.3 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	19
บทที่ 4 สรุป และเสนอแนะ	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ	6
4.1	รหัสและรายชื่อของตัวอย่างพืชสกุล Passiflora ที่ใช้ศึกษาจำนวน 19 สายพันธุ์	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.1	แสดงลักษณะใบของ *Passiflora yucatanensis*	14
4.2	ลักษณะรูปร่างใบของ *P. yucatanensis* (PA 01) (A) ใบจริง และ (B) ภาพวาดหลังใบ	15
4.3	รูปร่างใบหยักลักษณะสองแฉกในกลุ่มที่ 1 (A) *P. fledermouse* (PA 09) และ (B) *P. biflora* (PA 10)	16
4.4	รูปร่างใบหยักลักษณะสามแฉกในกลุ่มที่ 2 (A) *P. amethystina* (PA 12) และ (B) *P. tricuspis* (PA 15)	16
4.5	รูปร่างใบเรียวยาวด้านข้างในกลุ่มที่ 3 (A) *P. sexocellata* (PA 08) และ (B) *P. coriacea* (PA 11)	17
4.6	รูปร่างใบแบบรูปไข่ รูปหัวใจในกลุ่มที่ 4 (A) *P. auriculata* (PA 03) และ (B) *P. suberosa* (PA 14)	17
4.7	แสดงลักษณะดอกชนิดต่าง ๆ ของในสกุล *Passiflora*	18
4.8	แสดงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ตำแหน่ง ITSs บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) โดยใช้ พารามิเตอร์ Neighbor-joining method โดยเลขแสดงค่าที่มาจากค่า Bootstrap เท่ากับ 100	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย

จากยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) ที่เน้นการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพในระยะยาว โดยใช้หลักเศรษฐกิจพอเพียงเป็นแนวทางสำคัญ ส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ ให้มีประโยชน์สูงสุด

พืชในสกุล *Passiflora* มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของพื้นที่สูงในอเมริกาใต้เป็นไม้ประเภทเลื้อยมีอายุหลายปี จัดอยู่ในวงศ์ Passifloraceae ซึ่งพืชสกุลนี้แบ่งเป็น 14 สกุล (genus) โดย 5 สกุล กระจายอยู่ในแถบทวีปอเมริกา (the New World) และอีก 9 สกุล กระจายอยู่ในทวีปเอเชีย และแอฟริกา (the Old World) โดยพืชในวงศ์นี้มีพืชจำนวนมาก และมีความหลากหลายสูง ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 23 สกุลย่อย (subgenera) (Killip, 1938; Escobar, 1989) อย่างน้อย 400 - 520 สปีชีส์ (MacDougal และ Feuillet, 2004) และโดยส่วนใหญ่กระจายอยู่ในแถบ tropical America โดยพบประมาณ 130 สปีชีส์ในบราซิล สกุล *Passiflora* เป็นสกุลหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากมีคุณค่าทางเศรษฐกิจทั้งด้านเกษตร อุตสาหกรรม และทางการแพทย์ ในกรณีที่มีคุณค่าทางโภชนการนิยมเรียกชื่อทั่วไปว่า passion fruit ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการรับประทานผลสุก และการทำน้ำผลไม้ และถ้าให้ดอกสวยงาม นิยมเรียกชื่อทั่วไปว่า passion flower เช่น *P. incarnata* ที่นิยมนำมาใช้เป็นไม้ประดับ รวมทั้งการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในพืชสกุลนี้ (Dhawan et al., 2004) และการนำไปใช้ประโยชน์โดยเฉพาะสกัดสารที่มีฤทธิ์สงบระงับ (sedative)

ในประเทศไทยพบพืชในสกุลนี้ในชื่อทั่วไป คือ เสาวรส กระทกรก และแพสชั่นฟรุต ชื่อพื้นเมืองอื่นๆ รก กระโปรงทอง ละพุบาบี หญ้ารกช้าง ตำลึงฝรั่ง โดยมีทั้งที่เป็นสายพันธุ์ดั่งเดิม และนำเข้า รวมทั้งพืชในสกุลนี้มีความหลากหลายสูง ทำให้มีการเรียกชื่อ และให้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่หลากหลายเช่นกัน เช่น กระทกรก (*P. foetida*), เสาวรส (*P. laurifolia* และ *P. edulis*), ค้างคาว (*P. lunata*), เสาวรสใต้ (*P. perakensis*), สุคนธรส (*P. quadrangularis*), เสาวรสสยาม (*P. siamica*), ลิ้นมังกร (*P. vitifolia*) และ เสาวรสขน (*P. wilsonii*) เป็นต้น รวมทั้งในปัจจุบันมีการนำพืชสกุลนี้มาใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้นทั้งด้านโภชนการ โดยการรับประทานผลสุกที่มีทั้งผลสีเหลืองและผลสีม่วง มีเมล็ดจำนวนมาก เนื่องจากมีวิตามิน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตสูง ใช้เป็นผักสด มีรสขมเล็กน้อย หรือลวกจิ้มกับน้ำพริก และใช้แกงเลียง ทางด้านสมุนไพร ใช้ต้มน้ำดื่มแก้ไข้ ยาขับพยาธิ ขับเสมหะ และแก้ไอ รวมทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นไม้ประดับตามซุ้ม หรือตามรั้วบ้าน เนื่องจากมีดอกที่สวยงาม โดยมีระยางค์เรียงซ้อนกันหลายชั้น และมีกลิ่นหอม เช่น สร้อยมณีแดง และสร้อยฟ้า เป็นต้น

เนื่องจากมีทั้งสายพันธุ์ที่เป็นทั้งพืชดั้งเดิม และนำเข้า นอกจากนั้นยังมีการนำมาผสมข้ามสายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ จึงควรมีการศึกษาทั้งเพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ และประโยชน์ในข้อมูลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ยังไม่พบรายงานการศึกษาความหลากหลายของพืชสกุลนี้ในประเทศไทยทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา และระดับโมเลกุล มีเพียงการศึกษาในเรื่องภาวะโภชนการเท่านั้น แม้ว่า

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความสำคัญ แต่ในปัจจุบันการศึกษาหาความหลากหลายของพืชนิยมศึกษาด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล เช่นเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : PCR), เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP), เทคนิค Randomly Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) เป็นต้น เนื่องจากให้ผลที่ชัดเจน รวดเร็ว และสามารถศึกษาได้ในระดับสปีชีส์ โดยนิยมศึกษาในตำแหน่งของ noncoding region ทั้งของ internal transcribed spacers (ITS) และ *trnL-trnF* spacers เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีการแทนที่เบส (nucleotide substitutions) ในอัตราที่สูง (Taberlet et al., 1991)

ในปัจจุบันพืชในสกุล *Passiflora* มีความสำคัญทั้งในแง่คุณค่าทางอาหาร และพืชเศรษฐกิจ มีการนำเข้าสายพันธุ์ของพืชในสกุล Passiflora เข้ามาปลูกในประเทศไทยจำนวนมาก ซึ่งการศึกษาในระดับโมเลกุลนี้อาจจะช่วยให้การจัดจำแนกพืชในสกุล *Passiflora* ให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น และการศึกษาความหลากหลายของพืชในสกุล *Passiflora* ของประเทศจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งเป็นแนวทางในการอนุกรมวิธาน และอนุรักษ์พันธุกรรมพืชต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ของพืชในสกุล *Passiflora* จากพื้นที่ต่างๆ และสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ โดยเทคนิคระดับโมเลกุล

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชเฉพาะในสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ที่รวบรวมจากแปลงทดลองส่วนพระองค์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction (PCR) และ DNA sequencing ตำแหน่งยีนบนคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA: cp DNA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชในวงศ์ Passifloraceae แบ่งเป็น 14 สกุล (genus) โดย 5 สกุลกระจายอยู่ในแถบทวีปอเมริกา (the New World) และอีก 9 สกุล กระจายอยู่ในทวีปเอเชีย และแอฟริกา (the Old World) โดยพืชในวงศ์นี้มีพืชจำนวนมาก และมีความหลากหลายสูง ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 23 สกุลย่อย (subgenera) (Killip, 1938; Escobar, 1989) อย่างน้อย 400 - 520 สปีชีส์ (MacDougal และ Feuillet, 2004) และโดยส่วนใหญ่กระจายอยู่ในแถบ tropical America โดยพบประมาณ 130 สปีชีส์ในบราซิล สกุล *Passiflora* เป็นสกุลหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากมีคุณค่าทางเศรษฐกิจทั้งด้านเกษตร อุตสาหกรรม และทางการแพทย์ ในสายพันธุ์ที่มีคุณค่าทางโภชนการ นิยมเรียกชื่อทั่วไปว่า passion fruit เช่น *P. edulis* f. *flavicarpa* และ *P. edulis* และสกุล *Passiflora* ที่ให้ดอกสวยงาม นิยมเรียกชื่อทั่วไปว่า passion flower เช่น *P. incarnata*

พืชในสกุล *Passiflora* เป็นไม้เถาเลื้อยค่อนข้างคดไปงอมา ส่วนใหญ่เป็นไม้เถาเลื้อยได้ถึง 15 เมตร มีมือเกาะออกตามซอกใบ ใบเป็นใบเดี่ยว รูปใบมนโค้งผิวเรียบปลายใบแหลมโดยแยกเป็นสามแฉก ใบและเส้นใบบริเวณที่ติดต่อกันมีสีแดงเรื่อๆ บริเวณใกล้โคนก้านใบมีแฉกแหลมเล็กเรียงตรงกันข้ามสลับกัน ก้านใบ มีขนาดก้านไม้ขีด ยาว 5 –6 เซนติเมตร มีขนอ่อนเป็นฝอยขนาดเล็ก ลักษณะดอกเป็นดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ ดอกมีลักษณะก้านดอกยาวกว่าใบ ดอกบานมีลักษณะกลมกว้าง กลีบดอกมีหลากหลายสีที่พบบ่อยจะเป็นสีขาวแซมด้วยริ้วสีม่วง ดอกมีทั้งที่มีกลิ่นหอม และไม่มีกลิ่น กลีบดอก 5-6 กลีบ เป็นรูปรี กลีบเลี้ยง 5-6 กลีบ (ยกเว้น *P. triloba* กลีบดอก 6 กลีบ กลีบเลี้ยง 6 กลีบ) มีรยางค์เป็นเส้นยาว มีเกสรตัวผู้ 5 อัน เกสรตัวเมียเป็น 3 แฉก ดอกบานเต็มที่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-14 ซม. ผลค่อนข้างกลม เปลือกหนา และห่อหุ้มด้วยรก ผลสุกมีหลายสี เช่น สีแดงอมม่วง หรือเป็นสีเหลือง เมื่อผ่าผลแล้วใช้ช้อนตักเนื้อในรับประทานจะมีรสหวาน ปนเปรี้ยวนิดๆ มีกลิ่นหอม มีวิตามิน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตสูง ดอกและผลมีทั้งปี ขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด ปักชำกิ่งหรือเถา จึงเหมาะที่จะปลูกเพื่อเก็บผลรับประทานในครัวเรือน หรือปลูกจำนวนมากเก็บผลขาย สำหรับในไทยพืชในสกุล *Passiflora* ที่รู้จัก คือกระทกรก (*P. foetida*) ชื่อพื้นเมืองอื่นๆ รก หญ้ารกช้าง (ใต้) กระโปรงทอง (ใต้) ละพุบาบี (นราธิวาส -ปัตตานี) เครือขนตาช้าง (ศรีสะเกษ) ตำลึงฝรั่ง (ชลบุรี) เถาสิงห์โต และเถาเงาะ (ชัยนาท) เป็นต้น เป็นไม้เถาเลื้อยเนื้ออ่อนคล้ายตำลึง เถาค่อนข้างคดไปงอมา ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปใบมนโค้งผิวเรียบปลายใบแหลมโดยแยกเป็นสามแฉก สองแฉกล่างอาจแหลมหรือมน สำหรับส่วนแฉกปลายแหลม ผลสีเขียวค่อนข้างกลมขนาดปลายนิ้วมือ และห่อหุ้มด้วยรก ผลสุกมีสีเหลืองหรือแดง และมีการแพร่กระจายขึ้นอยู่ตามที่รกร้าง และบริเวณป่าพื้นราบโดยเลื้อยพันกิ่งต้นไม้อื่นๆ นอกจากนั้นแล้วพืชในสกุล *Passiflora* ยังนำมาใช้เป็นไม้ประดับ เช่น สุคนธรส (*P. quadrangularis*) และศรีมาลา (*P. coccinea*) เป็นต้น แต่ในปัจจุบันรู้จักพืชในสกุล *Passiflora* ในประโยชน์ทางด้านอาหาร ทั้งชนิดนำส่วนของยอดใช้เป็นผักสด ลวกจิ้มกับน้ำพริก และใช้แกงเลียง ส่วนของผลสุกมีบีตาแคโรทีน โพแทสเซียมและใยอาหารสูง ส่วนน้ำเสาวรสมีวิตามินซีสูง ทางด้านสมุนไพร ส่วนของเนื้อไม้ใช้เป็นยาควบคุมธาตุ ถอนพิษเบื่อเมาทุกชนิด และใช้รักษาบาดแผล ส่วนของรากใช้ต้มน้ำดื่มแก้ไข้ ขับพยาธิ ส่วนของใบ ใช้ตำให้ละเอียดแล้วคั้นเอาน้ำดื่มเป็นขับพยาธิ ส่วนของดอก ขับเสมหะและแก้ไอ ส่วนของผลนิยมนำมาแก้กระหาย และขับเสมหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับพืชในสกุล *Passiflora* สามารถแบ่งออกเป็น 12 สกุลย่อย เช่น *Astrophea, Deidamioides, Decaloba, Manicata, Tacsonia, Passiflora* และ *Psylanthus* โดยสกุลย่อยที่นำมาศึกษาบ่อยมี 4 สกุลย่อย คือ *Astrophea, Deidamioides, Decaloba* และ *Passiflora* และสกุลย่อยที่นิยมนำมารับประทาน คือ สกุลย่อย *Passiflora* และ *Tacsonia* โดย Fajardo และคณะ (1998) และ Sanchez และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของสกุลย่อย *Passiflora, Tacsonia, Decaloba, Distephana* และ *Astrophea* โดยใช้เทคนิค RAPD และ RFLP ตามลำดับ พบว่า *Passiflora* และ *Tacsonia* มีความใกล้ชิดกันมาก ในประเทศบราซิล *P. edulis* มีความสำคัญต่อการเกษตรมาก เนื่องจากมีการนำไปใช้ในการผลิตน้ำผลไม้ในระดับอุตสาหกรรม จึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ของพืชในสกุล *Passiflora* มากขึ้น เช่น การชักนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม ทำให้พืชในสกุลนี้มีความหลากหลายมากขึ้น ดังเช่น การศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่ามีตั้งแต่ 2N = 6, 12, 24 และ 36 โดย 2N = 24 หรือ 36 เป็นพืชชนิด polyploid (Melo และคณะ, 2001) เช่น *P. suberosa* หรือ การศึกษาการเพิ่มขึ้นของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค flow cytometry เช่น ตรวจสอบลูกผสมจากการนำ *P. edulis* มาผสมกับ *P. incarnata* โดยเทคนิค somatic hybrids (Otoni และคณะ, 1995) เป็นต้น

ในการบ่งชี้สายพันธุ์ของพืชในสกุล *Passiflora* นิยมใช้ลักษณะด้านสัญฐานวิทยา โดยเฉพาะลักษณะของใบ สี และลักษณะของดอก แต่เนื่องจากลักษณะดังกล่าวมีความหลากหลายสูง (highly variable trait) ดังเช่น Viana และคณะ (2510) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจาก 11 ลักษณะ คือ จำนวนดอก (number of flowers) จำนวนผล (number of fruits) น้ำหนักของผล (fruit mass) ขนาดความกว้างของผล (fruit diameter) ขนาดความยาวของผล (fruit length) จำนวนของเมล็ด (number of seeds) น้ำหนักของเมล็ด (seed mass) ขนาดความยาวของเมล็ดผล (seed length) ความกว้างของใบ (leaf width) ความยาวของใบ (leaf length) และพื้นที่ใบ (leaf area) ซึ่งสามารถแบ่งพืชในสกุล *Passiflora* จำนวน 6 สปีชีส์ ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) *P. palmeri* var. *sublanceolata, P. morifolia* และ *P. foetida* var. *foetida*, (2) *P. coriacea* และ *P. micropetala* และ (3) *P. suberosa* ซึ่ง *P. suberosa* มีลักษณะแตกต่างอย่างมาก แต่เมื่อใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์จำนวน 15 ไพรเมอร์ สามารถแบ่งพืชในสกุล *Passiflora* นี้ออกเป็น 6 กลุ่มตามสปีชีส์ โดยมี *P. coriacea* แตกต่างจากสปีชีส์อื่น

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และศึกษาความใกล้ชิดของสายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์นั้น นิยมศึกษาด้วยเทคนิค RAPD ดังเช่น Fajardo และคณะ (1998) ได้ศึกษาความหลากหลายของพืชในสกุล *Passiflora* จำนวน 52 ตัวอย่าง จาก 14 สปีชีส์ โดยใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์จำนวน 50 ไพรเมอร์ พบว่าบางสปีชีส์มีความหลากหลายภายในสปีชีส์สูง เช่น *P. ligularis* และ *P. adenopoda* ขณะที่บางบางสปีชีส์มีความหลากหลายภายในสปีชีส์ต่ำ เช่น *P. edulis* และ *P. maliformis* รวมทั้ง Crochemore และคณะ (2003) ได้ศึกษาความหลากหลายของพืชในสกุล *Passiflora* จำนวน 70 ตัวอย่าง จาก 11 สปีชีส์ รวมทั้งสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ passion fruit ชนิด *P. edulis* f. *flavicarpa* ที่มีผลสีเหลือง (yellow passion fruit) และ *P. edulis* ที่มีผลสีม่วง (purple passion fruit) ซึ่งทั้งสองชนิดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 18 เท่ากัน โดยใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ พบว่ามีความแตกต่างในระดับสปีชีส์อย่างชัดเจน รวมทั้งแยกกลุ่มระหว่าง *P. edulis* f. *flavicarpa* และ *P. edulis* ได้อย่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Muschner และคณะ (2003) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชในสกุล *Passiflora* จำนวน 61 สปีชีส์ หรือจำนวน 11 สกุลย่อยจาก 23 สกุลย่อย ในวงศ์ Passifloraceae ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลเป็นครั้งแรก โดยในตำแหน่ง ITS region ของ nuclear ribosomal ใช้ไพรเมอร์ตาม Desfeux และ Lejeune (1996) ตำแหน่ง *trnL-trnF* intergenic spacer ของคลอโรพลาสต์ (ประมาณ 1000 คู่เบส) ด้วยไพรเมอร์ e และ f ของ Taberlet และคณะ (1991) และ *rps4* gene (ประมาณ 570 คู่เบส) ของคลอโรพลาสต์ด้วยไพรเมอร์ *rps*5 และ *trn*S ตาม Souza-Chies และคณะ (1997) สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม (clades) คือ กลุ่ม (1) Passiflora ประกอบด้วย สกุลย่อย *Distephana*, *Dysosmia*, *Dysosmioides*, *Passiflora* และ *Tacsonioides* กลุ่ม (2) Decaloba ประกอบด้วย *Adopogyne*, *Decaloba*, *Murucuja* และ *Pseudomurucuja* และสุดท้ายคือ Astrophea ที่มีเพียงสกุลย่อย *Astrophea* โดยไม่พบสกุลย่อย *Deidamioides* และสามารถแบ่งกลุ่มดอกขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ได้ และยังพบว่า *P. actinia* มีความใกล้ชิดกับ *P. elegans* (Muschner และคณะ, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของจำนวนโครโมโซมที่พบว่า *P. actinia* และ *P. elegans* มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n = 18 (Melo และ Guerra, 2003)

รวมทั้ง Yockteng และ Nadot (2004) ได้ศึกษาความหลากหลายของพืชในสกุล *Passiflora* จำนวน 90 สปีชีส์ โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่ง *glutamine synthetase* gene (*ncpGS*) ในคลอโรพลาสต์ สามารถแบ่งได้ 8 สกุลย่อย คือ *Plectostemma, Granadilla, Astrophea, Deidamioides, Polyanthea, Dysosmia, Tetrapathea* และ *Tryphostemmatoides* นอกจากนั้นยังสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (clades) ที่สอดคล้องกับจำนวนโครโมโซม คือ (1) *Astrophea* ที่มีจำนวนโครโมโซม n = 12, (2) *Plectostemma* ที่มีจำนวนโครโมโซม n = 6 และ (3) *Granadilla* ที่มีจำนวนโครโมโซม n = 9 อย่างไรก็ตามในสกุลย่อย *Dysosmia* นั้นมีความหลากหลายของจำนวนโครโมโซม n = 9–11 จึงพิจารณาให้อยู่ใกล้ชิดกับกลุ่มของสกุลย่อย Granadilla ซึ่งสอดคล้องกับ Feuillet และ MacDougal (1999) ที่แบ่งได้ 4 สกุลย่อย คือ *Astrophea, Deidamioides, Passiflora* และ *Plectostemma*

ปัจจุบันนิยมหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในการหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของพืชดอก Taberlet et al. (1991) ได้ทำการศึกษาไพรเมอร์ชนิดใหม่ขึ้นมา เพื่อใช้ในการจำแนกพืช โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของ tobacco , marchantia และ rice บริเวณยีน *trn*T (UGU) และ *trn*F (GAA) ซึ่งเป็น single-copy region ขนาดใหญ่ที่มีความจำเพาะ และพบว่ายีน transcribing tRNA genes (*trn*) เป็นยีนอนุรักษ์ เมื่อออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tRNA 6 ชนิด คือ a, b, c, d, e, และ f แสดงดังตารางที่ 1 โดยไพรเมอร์ a และ b ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*T(UGU) และ *trn*L(UAA) 5'exon ไพรเมอร์ c และ d ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*L(UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon และไพรเมอร์ e และ f ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*L (UAA) 3'exon และ *trn*F (GAA) ขนาดของ PCR product ที่คาดว่าจะพบมีขนาด 773, 833 และ 251 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ a และ b ขนาด 577, 614 และ 389 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ ไพรเมอร์ c และ d และ ขนาด 438, 324 และ 158 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ e และ f ในพืชชนิด tobacco , marchantia และ rice เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน algae, bryophytes, pteridophytes, gymnosperms และ angiosperm จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่าไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมอร์ c และ d สามารถจำแนกพืชดังกล่าวได้มากชนิดที่สุด คือจำแนกได้ถึง 15 ชนิดใน 19 ชนิด จึงนิยมนำไพรเมอร์ c และ d มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของพืช

ตารางที่ 2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

Name	sequence 5' – 3'
a	CATTACAAATGCGATGCTCT
b	TCTACCGATTTCGCCATATC
c	CGAAATCGGTAGACGCTACG
d	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
e	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
f	ATTTGAACTGGTGACACGAG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1.1.1 บีกเกอร์ (beaker)
3.1.1.2 กระบอกตวง (cylinder)
3.1.1.3 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
3.1.1.4 ปากคีบ (forcept)
3.1.1.5 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
3.1.1.6 ช้อนตักสารเคมี (spatular)
3.1.1.7 โกร่ง และที่บด (mortar and pestle)
3.1.1.8 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
3.1.1.9 ทิป (tip) ขนาดต่างๆ
3.1.1.10 คิวเวท (cuvette)
3.1.1.11 ตู้เย็น (refrigerator) หรือตู้แช่แข็ง (deep freeze)
3.1.1.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
3.1.1.13 เครื่องชั่ง (balance)
3.1.1.14 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)
3.1.1.15 เครื่องช่วยผสม (vortex)
3.1.1.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
3.1.1.17 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
3.1.1.18 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
3.1.1.19 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler)
3.1.1.20 เครื่องอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
3.1.1.21 เครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ (UV transilluminator)
3.1.1.22 ชุดถ่ายภาพเจล (gel documentation)
3.1.1.23 เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven)
3.1.1.24 กรรไกร (scissors)
3.1.1.25 มีดผ่าตัด (knives และ scalpel)
3.1.1.26 อุปกรณ์การวาดภาพ เช่น ดินสอ ยางลบ ไม้บรรทัด เป็นต้น
3.1.1.27 กล้องถ่ายภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 วัสดุ และสารเคมี

3.1.2.1 เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol)

3.1.2.2 น้ำกลั่น (distilled water)

3.1.2.3 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

3.1.2.4 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF1 ของบริษัท vivantis (Extraction DNA Plant)

3.1.2.5 สารละลาย TBE บัฟเฟอร์ (Tris Borate EDTA buffer)

3.1.2.6 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotide, dNTPs) ของบริษัท Roche

3.1.2.7 ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) บริษัท New England Biolabs

3.1.2.8 RNase A

3.1.2.9 ไพร์เมอร์ (primer)

3.1.2.10 เจลอะกาโรส (agarose gel)

3.1.2.11 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromind)

3.1.2.12 สีย้อมดีเอ็นเอ (dye)

3.1.2.13 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

3.1.2.14 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลคู่เบส

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบของพืชในสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ต่าง ๆ จากแปลงทดลองส่วนพระองค์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี โดยตัวอย่างที่เก็บจะเป็นพืชสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ที่รวบรวมมาจากต่างประเทศ และสายพันธุ์พื้นบ้าน และแบ่งสายพันธุ์เป็นรหัสตัวย่อ PA บันทึกรายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยาเฉพาะลักษณะของใบ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกสายพันธุ์

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมตัวอย่างใบพืชสกุล *Passiflora* ที่ไม่เป็นโรคมาทำความสะอาดโดยล้างน้ำสะอาดเอาพวกคราบฝุ่นและสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออก แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ฆ่าเชื้อแล้วหรือผึ่งให้แห้ง นำมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดตัวอย่างใบพืช โดยตัดเอาส่วนเส้นกลางและก้านใบออกทิ้งไป นำส่วนใบที่ตัดได้มาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอปริมาณประมาณ 50 - 100 มิลลิกรัม

นำมาบดโดยไนโตรเจนเหลว โดยนำตัวอย่างพืชใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็น พร้อมเติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่าง และบดตัวอย่างจนละเอียดเป็นผง ตักตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis) โดยใช้วิธีการตามคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอ โดยมีรายละเอียดดังนี้ เติมสารละลาย buffer PL ปริมาตร 280 ไมโครลิตร และผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex) เป็นระยะเวลา 30 วินาที พร้อมเติม proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดทดลองไปมา 2-3 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง (หรือเป็นระยะเวลาข้ามคืน หากสารละลายไม่ใส) โดยระหว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบ่มให้กลับหลอดทดลองไปมา เพื่อให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันและเนื้อเยื่อถูกย่อยได้หมด (ในกรณีตัวอย่างย่อยไม่หมดอาจเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม หรือเพิ่มปริมาณ proteinase K) นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000-12,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนและเศษเซลล์ โดยสารละลายดีเอ็นเอจะละลายอยู่ในชั้นสารละลายน้ำซึ่งจะแยกชั้นอยู่ด้านบน ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนของหลอดทดลอง (ประมาณ 300 ไมโครลิตร) ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ในกรณีไม่มีการแยกชั้นสามารถเพิ่มระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยงได้ เติม RNase ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5-10 นาที

เติมสารละลาย buffer PB ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ (ประมาณ 600 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดทดลองไปมาหลายๆครั้ง จนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ซึ่งสารละลายจะมีลักษณะใส เติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที เพื่อการตกตะกอนดีเอ็นเอ ดูดสารละลายใสที่ได้ใส่ในคอลัมน์ (ประมาณ 900 - 1000 ไมโครลิตร) ที่มีหลอดรองรับ (collection tube) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที เทสารละลายใสที่อยู่ในหลอดรองรับทิ้ง ในกรณีได้สารละลายใสจำนวนมากให้ทำซ้ำอีกครั้ง ล้างเมมเบรนของคอลัมน์ด้วยการเติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่มีหลอดรองรับ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที เทสารละลายใสที่อยู่ในหลอดรองรับทิ้ง สามารถทำซ้ำอีกครั้งหากสีของเมมเบรนในคอลัมน์ยังเป็นสีเข้ม และทำให้คอลัมน์แห้ง โดยนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลที่เหลือออกให้หมด ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ เติม elution buffer (ที่บ่มไว้แล้วที่ 65 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะล้างดีเอ็นเอจากเมมเบรนให้ดีเอ็นเอตกลงในหลอด นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของดีเอ็นเอ และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลาย 1XTBE buffer วางลงบนเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า เทสารละลาย 1XTBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าอะกาโรสเจล ดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 3 - 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม 1 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออน 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลคู่เบส ปล่อยกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปบวก โดยใช้ความต่างศักย์ (voltage) คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นสีย้อมเคลื่อนที่ไปประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของความยาวของเจล นำอะกาโรสเจลไปแช่ในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นล้างสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ออกโดยการนำอะกาโรสเจลโดยแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 20-30 นาที ตรวจสอบผลการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอโดยแสงยูวี และบันทึกผลเป็นภาพถ่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมาทำการเจือจาง 100 เท่า (dilution factor เท่ากับ 100) ด้วยการดูดน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 495 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายตัวอย่างออกมาใส่คิวเวทท์ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น biomate 3 V2.100 โดยมีน้ำกลั่นเป็นค่ามาตรฐาน จากนั้นวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยดูได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 ซึ่งค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.60-2.00 นำค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร มาใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ จากค่ามาตรฐาน ถ้าวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1 แสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นคือ

ค่า OD เท่ากับ 1 มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่า OD เท่ากับ A มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ Ax50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร --- (1)

ในการวัดค่า OD นี้ ได้นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจาง 100 เท่า ดังนั้นค่า dilution factor เท่ากับ 100 ต้องนำกลับเข้าไปคูณกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่คำนวณได้ (1) เพื่อให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอจริงทั้งหมด นั่นคือ

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด = Ax50x100 (dilution factor)

= B ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร --- (2)

เมื่อ A = ค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร

B = ความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เมื่อทราบความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดแล้ว จึงนำมาคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในเทคนิค PCR ในหน่วยไมโครลิตร ตัวอย่าง เช่น ต้องการปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม (1000 นาโนกรัม) มีวิธีการคำนวณดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอ B ไมโครกรัม ต้องดูดสารละลายดีเอ็นเอ = 1 มิลลิลิตร

ปริมาณดีเอ็นเอ B ไมโครกรัม ต้องดูดสารละลายดีเอ็นเอ = 1000 ไมโครลิตร

ปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ต้องดูดสารละลายดีเอ็นเอ = 1000/B ไมโครลิตร

ปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ต้องดูดสารละลายดีเอ็นเอ = C ไมโครลิตร --- (3)

ดังนั้นหากต้องการปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม เพื่อใช้ในการทำเทคนิค PCR โดยถ้าวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ A และคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอได้เท่ากับ B ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องดูดสารละลายดีเอ็นเอเท่ากับ C ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ตำแหน่ง *trn*L intron ระหว่าง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพรเมอร์ c (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3') และไพรเมอร์ d (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3') ตาม Taberlet และคณะ (1991) โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพรเมอร์ c และ d ความเข้มข้น 0.8 พิโคโมล ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้น initiation denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product จากทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส เก็บรักษา PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สำหรับตำแหน่ง internal transcribed spacers (ITSs) บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White และคณะ, 1990) และ ITS1 Passiflora (5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3') และไพรเมอร์ ITS2 Passiflora (5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3') (Desfeux และ Lejeune,1996) โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพรเมอร์ c และ d ความเข้มข้น 0.8 พิโคโมล ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย ITS1/ ITS4 ที่สภาวะ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สำหรับ ITS1/ITS2 Passiflora สภาวะ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำ PCR product ไปศึกษาต่อในเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำ PCR product ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ที่บริษัท 1 st Base ประเทศสิงคโปร์ นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และนำตัวอย่าง ได้แก่ AY 632705 *P. biflora*, DQ 238787 *P. coriacea*, EU 258423 *P. organensis* และ EU 258456 *P. tricuspis* โดยนำ AY 632713 *P. mexicana* มาใช้เป็น outgroup และวิเคราะห์หา phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยโปรแกรม Phylip package version 3.6 วิเคราะห์ข้อมูลค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากจำนวนชุดข้อมูล (multiple data sets) 100 ชุด จัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี Neighbor-joining และใช้โปรแกรม Consense คัดเลือกรูปแบบ Phylogenetic tree ที่น่าจะมีความเป็นไปได้และถูกต้องมากที่สุด จากนั้นใช้โปรแกรม TreeView32 ในการตกแต่งหรือเลือกรูปแบบของ Phylogenetic tree

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผล และอภิปรายผลการทดลอง

4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างตัวอย่างพืชสกุล *Passiflora* ที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้มีตัวอย่างทั้งหมด 19 ตัวอย่าง (PA 01 – PA 19) โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างใบของพืชในสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ต่าง ๆ จากพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี โดยตัวอย่างที่เก็บจะเป็นพืชสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ที่รวบรวมมาจากต่างประเทศ จำนวน 17 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ในประเทศจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ กะทกรก (*P. foetida*) และเสาวรส (*P. edulis* var. *flavicarpa*) ดังตารางที่ 4.1

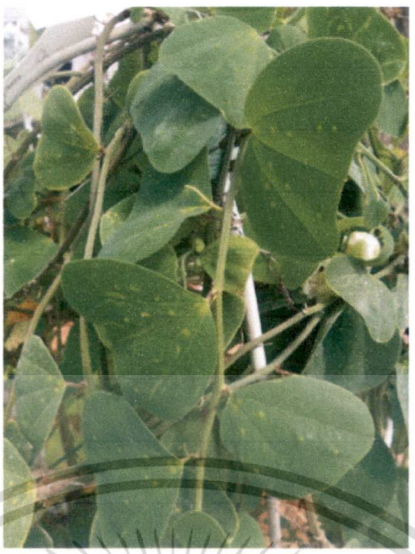
ตารางที่ 4.1 รหัสและรายชื่อของตัวอย่างพืชสกุล *Passiflora* ที่ใช้ศึกษาจำนวน 19 สายพันธุ์

รหัส	รายชื่อของตัวอย่าง	รหัส	รายชื่อของตัวอย่าง
PA 01	*P. yucatanensis*	PA 11	*P. coriacea*
PA 02	*P. misera*	PA 12	*P. amethystina*
PA 03	*P. auriculata*	PA 13	*P. laurifolia*
PA 04	*P. mucronata*	PA 14	*P. suberosall*
PA 05	*P. micropetala*	PA 15	*P. tricuspis*
PA 06	*P. lutea*	PA 16	*P. dispar*
PA 07	*P. quinquangularis*	PA 17	*P. edmundoi*
PA 08	*P. sexocellata*	PA 18	*P. edulis* var. *flavicarpa*
PA 09	*P. fledermouse*	PA 19	*P. foetida*
PA 10	*P. biflora*	รวม	19 ตัวอย่าง

4.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยา

พืชสกุล *Passiflora* หรือ passion fruit ในประเทศนิยมเรียกเสาวรสสำหรับสายพันธุ์เพื่อการบริโภคและการค้า และเรียกกะทกรกสำหรับสายพันธุ์ที่ขึ้นในพื้นที่รกร้าง ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ โดยชนิดของใบเป็นใบเดี่ยว มีการจัดเรียงตัวของใบบนลำต้นเป็นแบบสลับ ดังตัวอย่างรูปที่ 4.1 ที่เป็นการจัดเรียงของใบในตัวอย่าง *P. yucatanensis* (PA 01) และพบว่ารูปร่างของใบมีหลากหลายลักษณะ โดยส่วนใหญ่มีลักษณะแบบใบกว้าง ปลายใบมีทั้งปลายใบแหลม เป็นติ่งแหลม การเว้าตื้น การเว้าบุ๋ม ลักษณะขอบใบมีการเว้าหยักเช่นกัน มีทั้งขอบใบหยักเว้า และหยักลึก และมีทั้งโคนใบมน และโคนใบรูปหัวใจ รวมทั้งมีต่อมบนใบ เมื่อนำใบสด (รูปที่ 4.2A) มาวาดภาพหลังใบ (รูปที่ 4.2B) สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ดังสรุปในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

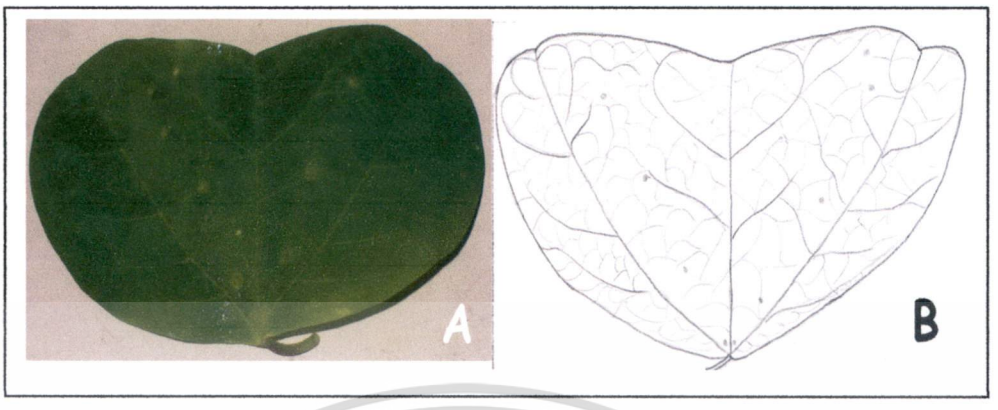


รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะใบของ *Passiflora yucatanensis*

ตารางที่ 4.1 การจัดจำแนกตัวอย่างพืชสกุล *Passiflora* ตามลักษณะรูปร่างของใบ

กลุ่มที่	รูปร่างใบ	สายพันธุ์
1	หยักลักษณะสองแฉก	*P. yucatanensis* (PA 01), *P. misera* (PA 02), *P. micropetala* (PA 05), *P. quinquangularis* (PA 07), *P. fledermouse* (PA 09), *P. biflora* (PA 10)
2	หยักลักษณะสามแฉก	*P. lutea* (PA 06), *P. amethystine* (PA 12), *P. suberosa* (PA 14), *P. tricuspis* (PA 15), *P. edmundoi* (PA 17), *P. edulis* (PA 18), *P. foetida* (PA 19)
3	เรียวยาวด้านข้าง	*P. sexocellata* (PA 08), *P. coriacea* (PA 11)
4	รูปไข่-รูปหัวใจ	*P. auriculata* (PA 03), *P. mucronata* (PA 04), *P. laurifolia* (PA 13), *P. dispar* (PA 16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลักษณะรูปร่างใบของ *P. yucatanensis* (PA 01) (A) ใบจริง และ (B) ภาพวาดหลังใบ

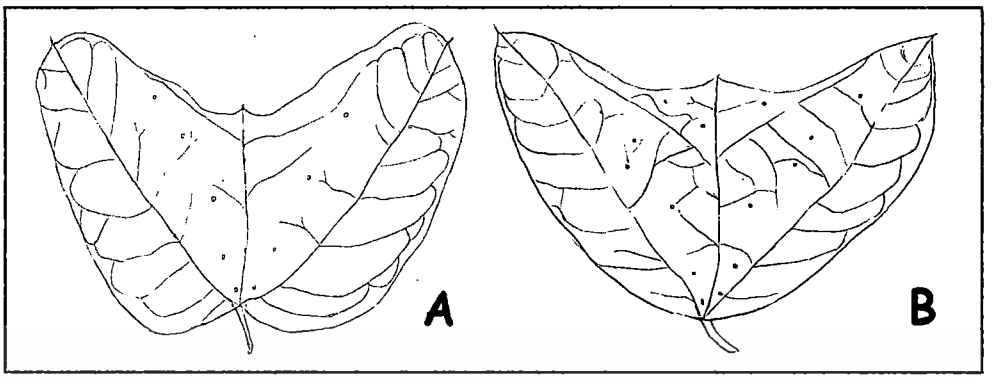
ในกลุ่มที่ 1 มีรูปร่างใบหยักลักษณะสองแฉก ประกอบด้วยจำนวน 6 ตัวอย่าง คือ *P. yucatanensis* (PA 01), *P. misera* (PA 02), *P. micropetala* (PA 05), *P. quinquangularis* (PA 07), *P. fledermouse* (PA 09) และ *P. biflora* (PA 10) แสดงตัวอย่าง *P. fledermouse* (PA 09) และ *P. biflora* (PA 10) ในรูปที่ 4.3A และรูปที่ 4.3B ตามลำดับ

ในกลุ่มที่ 2 มีรูปร่างใบหยักลักษณะสามแฉก ประกอบด้วยจำนวน 7 ตัวอย่าง คือ *P. lutea* (PA 06), *P. amethystine* (PA 12), *P. suberosa* (PA 14), *P. tricuspis* (PA 15), *P. edmundoi* (PA 17), *P. edulis* (PA 18) และ *P. foetida* (PA 19) แสดงตัวอย่าง *P. amethystine* (PA 12) (รูปที่ 4.4A) และ *P. tricuspis* (รูปที่ 4.4B)

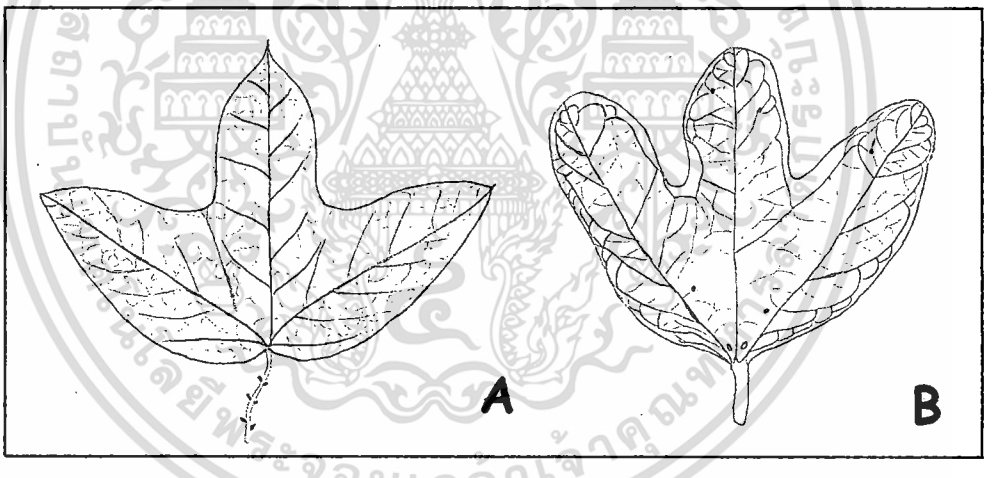
ในกลุ่มที่ 3 มีรูปร่างใบเรียวยาวด้านข้าง ประกอบด้วยจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ *P. sexocellata* (PA 08) (รูปที่ 4.5A) และ *P. coriacea* (PA 11) (รูปที่ 4.5B)

และในกลุ่มที่ 4 มีรูปร่างใบที่ขอบใบไม่มีการเว้า หรือหยัก ทำให้มีลักษณะใบแบบรูปไข่ รูปหัวใจ ประกอบด้วยจำนวน 4 ตัวอย่าง คือ *P. auriculata* (PA 03), *P. mucronata* (PA 04), *P. laurifolia* (PA 13) และ *P. dispar* (PA 16) แสดงตัวอย่าง *P. auriculata* (PA 03) และ *P. mucronata* (PA 04) ในรูปที่ 4.6A และรูปที่ 4.6B ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



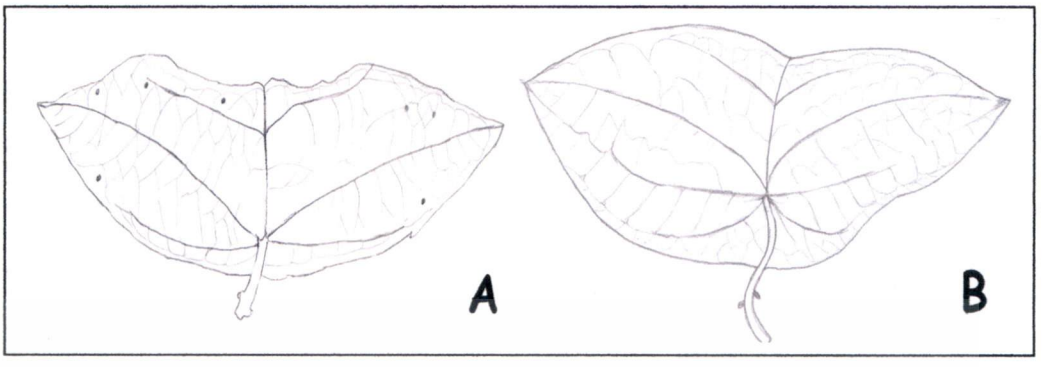
รูปที่ 4.3 รูปร่างใบหยักลักษณะสองแฉกในกลุ่มที่ 1 (A) *P. fledermouse* (PA 09) และ (B) *P. biflora* (PA 10)



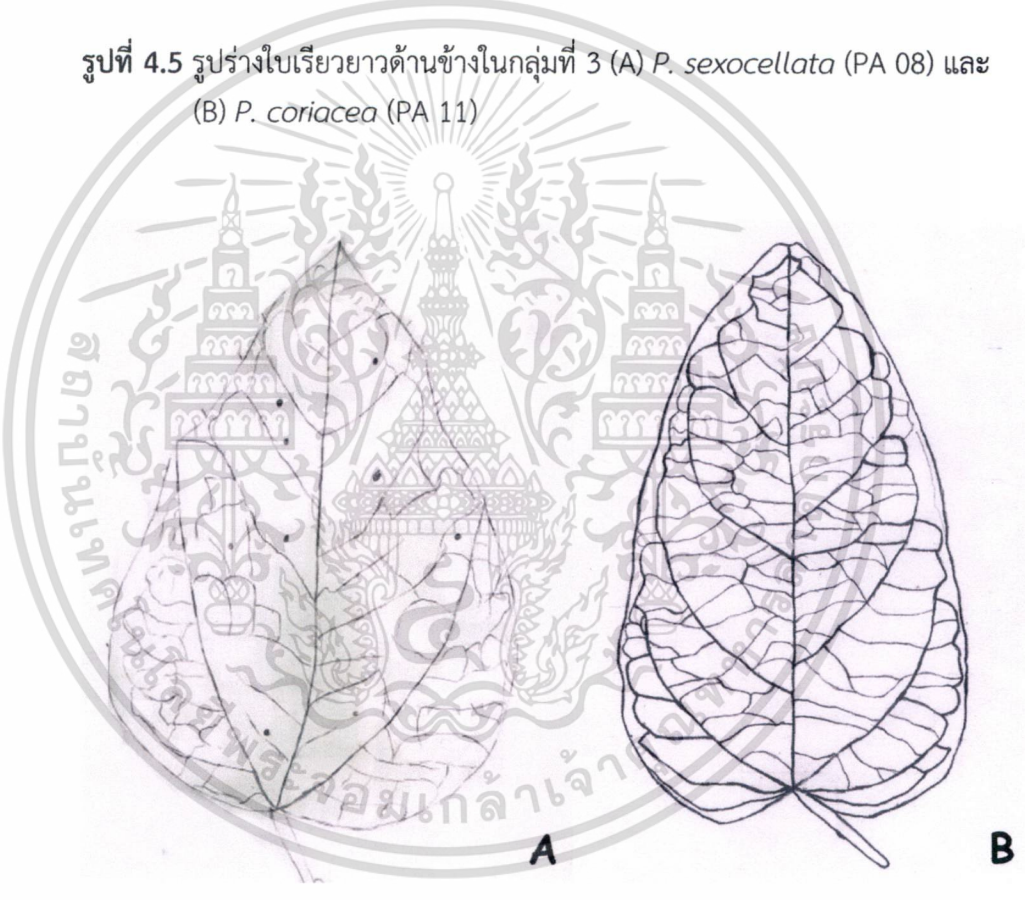
รูปที่ 4.4 รูปร่างใบหยักลักษณะสามแฉกในกลุ่มที่ 2 (A) *P. amethystine* (PA 12) และ (B) *P. tricuspis* (PA 15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 4.5 รูปร่างใบเรียวยาวด้านข้างในกลุ่มที่ 3 (A) *P. sexocellata* (PA 08) และ (B) *P. coriacea* (PA 11)



รูปที่ 4.6 รูปร่างใบแบบรูปไข่ รูปหัวใจในกลุ่มที่ 4 (A) *P. auriculata* (PA 03) และ (B) *P. mucronata* (PA 04)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

131180

สำหรับดอกของพืชสกุล *Passiflora* เป็นไม้ประดับที่มีความสวยงาม (รูปที่ 4.7) มีโครงสร้างที่เป็นลักษณะเฉพาะ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ดึงดูดให้พวกผึ้งเข้ามาช่วยผสมเกสร ในเขตร้อนของประเทศอเมริกาจะตั้งคานไม้ไว้ใกล้กับพืชสกุล *Passiflora* เพื่อกระตุ้นให้ผึ้งมาสร้างรัง บางสายพันธุ์มีขนาดและโครงสร้างเหมาะที่จะให้นกแฮมมิ่ง ผึ้ง ตัวต่อ หรือค้างคาวมาช่วยในการผสมเกสร ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถรวบรวมตัวอย่างของดอกจากสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการศึกษาได้ เนื่องจากบางสายพันธุ์ไม่ออกดอก หรือออกดอกช่วงเวลาสั้นๆ

รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะดอกชนิดต่าง ๆ ของในสกุล *Passiflora*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ตำแหน่ง *trn*L intron ระหว่าง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพรเมอร์ c (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3') และไพรเมอร์ d (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3') ตาม Taberlet และคณะ (1991) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้แม้ว่าปรับเปลี่ยนทั้งสารที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยา และสภาวะที่เหมาะสม และสำหรับตำแหน่ง internal transcribed spacers (ITSs) บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) เมื่อใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White และคณะ, 1990) สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BlastN เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยส่วนใหญ่ไม่พบข้อมูลที่มีลำดับพันธุกรรมที่เหมือนกัน หรือจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนเพียงบางส่วนเท่านั้น (ประมาณ 250-300 คู่เบส)

เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITSs บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 Passiflora (5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3') และไพรเมอร์ ITS2 Passiflora (5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3') (Desfeux และ Lejeune, 1996) annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ในทุกตัวอย่าง และพบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียวประมาณ 650 คู่เบส เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BlastN เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับสกุล *Passiflora* และได้คัดเลือกมา 5 สปีชีส์ โดยเป็นสปีชีส์เดียวกับตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 3 สปีชีส์ คือ AY632705 *P. biflora*, DQ238787 *P. coriacea* และ EU258456 *P. tricuspis* และใช้ EU258423 *P. organensis* และ AY632713 *P. mexicana* เป็น outgroup

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง ITSs บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอทั้งหมด 25 ตัวอย่าง เมื่อทำการตรวจทานลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit และวิเคราะห์ความแตกต่างในการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalX นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยชุดโปรแกรม Phylip ซึ่งสามารถสร้างเป็นแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ของพืชสกุล *Passiflora* และแสดงค่า bootstrap ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชุดข้อมูลซ้ำ (boostripping) 100 ครั้ง บนแผนภูมิได้ดังรูปที่ 4.8 โดยพบว่า AY632713 *P. mexicana* ที่นำมาเป็น outgroup แยกออกจากกลุ่มตัวอย่างอย่างชัดเจน แต่สำหรับ EU258423 *P. organensis* มีความใกล้ชิดกับ PA 02 *P. misera*, PA 05 *P. micropetala* และ PA 15 *P. tricuspis* และสปีชีส์เดียวกับตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 3 สปีชีส์ มีความเหมือนกัน คือ AY632705 *P. biflora* มีความเหมือนกับ PA 10, DQ238787 *P. coriacea* มีความเหมือนกับ PA 11 และ EU258456 *P. tricuspis* มีความเหมือนกับ PA 15

สามารถจำแนกความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ทั้ง 19 สปีชีส์ ออกได้เป็น 4 กลุ่ม ที่มีความแตกต่างกัน คือ

กลุ่ม 1 ประกอบด้วย *P. micropetala* (PA 05), *P. misera* (PA 02) และ *P. tricuspis* (PA 15) รวมทั้ง *P. organensis* (EU258423) และ *P. tricuspis* (EU258456)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

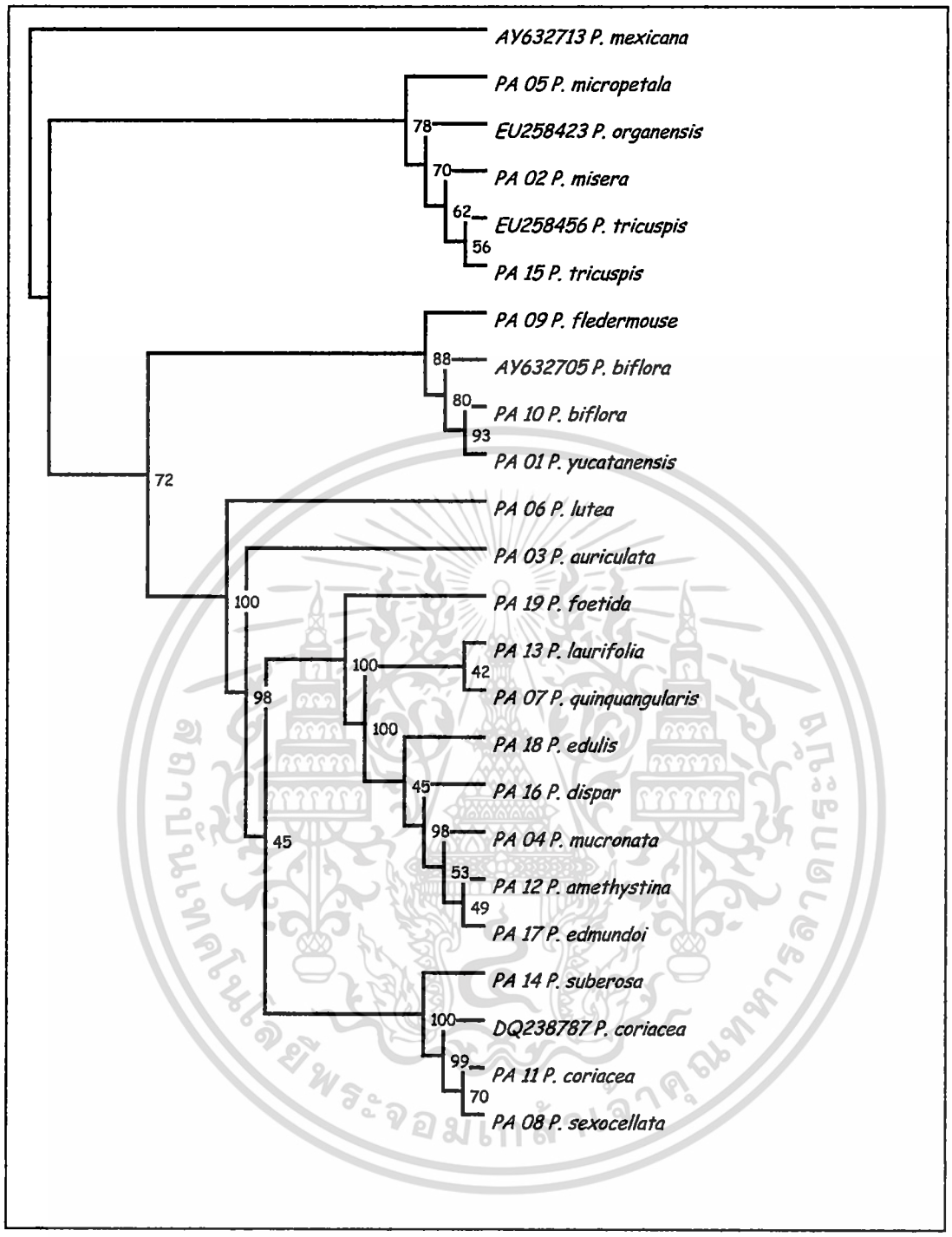
กลุ่ม 2 ประกอบด้วย *P. yucatanensis* (PA 01), *P. fledermouse* (PA 09) และ *P. biflora* (PA 10) รวมทั้ง *P. biflora* (AY632705)

กลุ่ม 3 ประกอบด้วย *P. mucronata* (PA 04), *P. quinquangularis* (PA 07), *P. amethystina* (PA 12), *P. laurifolia* (PA 13), *P. dispar* (PA 16), *P. edmundoi* (PA 17), *P. edulis* (PA 18) และ *P. foetida* (PA 19)

กลุ่ม 4 ประกอบด้วย *P. suberosa* (PA 14), *P. coriacea* (PA 11) และ *P. sexocellata* (PA 08) รวมทั้ง *P. coriacea* (DQ238787)

โดยพบว่า *P. edulis* (PA 18) หรือเสาวรส สายพันธุ์สำหรับการบริโภคและการค้า และ *P. foetida* (PA 19) หรือกะทกรกสายพันธุ์ที่ขึ้นในพื้นที่รกร้าง มีลักษณะของใบอยู่ในกลุ่มที่ 2 ที่มีรูปร่างใบมีขอบใบมีการเว้า หรือหยัก ทำให้มีลักษณะใบแบบสามแฉก เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จัดทั้ง 2 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และเมื่อนำความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ที่ได้ ร่วมกับกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบ พบว่ามีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูง โดยสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม เช่นกัน ดังตัวอย่างการจัดจำแนกตัวอย่างตามลักษณะรูปร่างของใบในกลุ่มที่ 3 ที่ใบมีรูปร่างใบเรียวยาวด้านข้าง คือ *P. sexocellata* (PA 08) และ *P. coriacea* (PA 11) มีความใกล้ชิดกันมาก รวมทั้งเมื่อเปรียบเทียบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่ม 2 ที่ประกอบด้วย *P. yucatanensis* (PA 01), *P. fledermouse* (PA 09) และ *P. biflora* (PA 10) มีลักษณะรูปร่างของใบหยักลักษณะสองแฉกทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตาม *P. sexocellata* (PA 08) และ *P. coriacea* (PA 11) อยู่ในกลุ่มที่ 4 ที่มี *P. suberosa* (PA 14) รวมอยู่ด้วย แต่มีรูปร่างใบหยักลักษณะสามแฉก ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ให้ผลที่แตกต่างจาก Viana และคณะ (2510) ที่แบ่งกลุ่มพืชในสกุล *Passiflora* จำนวน 6 สปีชีส์ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 11 ลักษณะ ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยพบว่า *P. coriacea* และ *P. micropetala* อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และ *P. suberosa* มีลักษณะแตกต่างออกไปอย่างมาก แต่เมื่อใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์จำนวน 15 ไพรเมอร์ สามารถแบ่งพืชในสกุล *Passiflora* นี้ออกเป็น 6 กลุ่มตามสปีชีส์ โดยมี *P. coriacea* แตกต่างจากสปีชีส์อื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ตำแหน่ง ITSs บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) โดยใช้ พารามิเตอร์ Neighbor-joining method โดยเลขแสดงค่าที่มาจากค่า Bootstrap เท่ากับ 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุป และเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ของพืชในสกุล *Passiflora* จากพื้นที่ต่างๆ และสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ โดยเทคนิคระดับโมเลกุล และได้รวบรวมตัวอย่างใบของพืชในสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ต่าง ๆ จากพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี โดยตัวอย่างที่เก็บจะเป็นพืชสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ที่รวบรวมมาจากต่างประเทศ เสาวรส (*P. edulis*) สายพันธุ์สำหรับการบริโภคและการค้า และกะทกรก (*P. foetida*) สายพันธุ์ที่ขึ้นในพื้นที่รกร้าง รวม 19 สปีชีส์ เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ พบว่าใบเป็นใบเดี่ยว มีการจัดเรียงตัวของใบบนลำต้นเป็นแบบสลับ รูปร่างของใบมีหลากหลายลักษณะ สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มใบหยักลักษณะสองแฉก หยักลักษณะสามแฉก ใบเรียวยาวด้านข้าง และใบรูปไข่และรูปหัวใจ

และเมื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง internal transcribed spacers (ITSs) บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 Passiflora และไพรเมอร์ ITS2 Passiflora สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ในทุกตัวอย่าง และพบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียวประมาณ 650 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BlastN เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับสกุล *Passiflora* และได้คัดเลือกมา 5 สปีชีส์ โดยเป็นสปีชีส์เดียวกับตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 3 สปีชีส์ คือ AY632705 *P. biflora*, DQ238787 *P. coriacea* และ EU258456 *P. tricuspis* และใช้ EU258423 *P. organensis* และ AY632713 *P. mexicana* เป็น outgroup แสดงความหลากหลายในระดับสปีชีส์สูง สามารถจำแนกความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ทั้ง 19 สปีชีส์ ออกได้เป็น 4 กลุ่ม และเมื่อนำความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ที่ได้ ร่วมกับกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบ พบว่ามีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูง โดยพบว่า *P. edulis* หรือเสาวรส สายพันธุ์สำหรับการบริโภคและการค้า และ *P. foetida* หรือกะทกรกสายพันธุ์ที่ขึ้นในพื้นที่รกร้าง มีรูปร่างใบแบบสามแฉก เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จัดทั้ง 2 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

Crochemore, M.L., Molinari, H.B., Vieira, L.G.E. 2003. Genetic diversity in passion fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. Brazilian Archives of Biology and Technology. 46: 521-527.

Escobar, L.K. 1989. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. Annals of the Missouri Botanical Garden. 76: 877–885.

Fajardo, D., Angel, F., Grum, M., Tohme, J., Lobo, M., Roca, W.M., Sanchez, I. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. Euphytica. 101: 341- 347.

Feuillet, C. and MacDougal, J.M. 1999. XVI International Botanical Congress, Raven, P., Saint Louis, Missouri, USA, Abstract. 4295.

Killip, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. Field Museum of Natural History, Botanical Series 19: 1–613.

Lorenz-Lemke, A.P., Muschner, V.C., Bonatto, S.L., Cervi, A.C., Salzano, F.M. and Freitas, L.B. 2005. Phylogeographic Inferences Concerning Evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) Based on ITS (nrDNA) Variation. Annals of Botany. 95: 799–806.

MacDougal, J.M. 1994. Revision of *Passiflora*, subgenus *Decaloba*, Section Pseudodysosmia (Passifloraceae). Systematic Botany Monographs. 41: 1–146.

MacDougal, J.M. and Feuillet, C. 2004. Systematics. Pp.27-31. *In:* Ulmer, T. and MacDougal, J.M. *Passiflora,* Passionftowers of the world. Timber Press, Portland.

Melo, N.F., Cervi, A. C. and Guerra, M. 2001. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). Plant Systematic Evolution. 226: 69- 84.

Melo, N.F., Guerra, M. 2003. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. Annals of Botany. 92: 309–316.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Muschner, V.C., Lorenz A.P., Cervi, A.C., Bonatto, S.L., Souza-Chies, T.T., Salzano, F.M. and Freitas, L.B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis in *Passiflora* (Passifloraceae). American Journal of Botany 90: 1229–1238.

Otoni, W.C., Blackhall, N.W., D'utra Vaz, F.B. et al. 1995. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener, and *P. incarnata* L. Journal of Botany. 46: 777-785.

Sanchez, I., Angel, F., Grum, M., Duque, M.C., Lobo, M. and Tohme, J. 1999.Variability of chloroplast DNA in the genus *Passiflora*. Euphytica 106: 15–26.

Souza-Chies, T.T., Bittar, G., Nadot, S., Carter, L., Besin, E. and Lejeune, B. 1997. Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene rps4. Plant Systematics and Evolution. 204: 109-123.

Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology. 17: 1105–1109.

Yockteng, R. and Nadot, S. 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). Molecular Phylogenetics and Evolution. 31: 379–396.

Viana, A.J.C., Souza, M.M., Araujo, I.S., Correa, R.X. and Ahnert, D. 2010. Genetic diversity in *Passiflora* species determined by morphological and molecular characteristics. Biologia Plantarum. 54: 535-538.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้