สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชสกุล *Passiflora*

Study on genetic diversity and tissue culture in *Passiflora* sp.

T117246

นางสาวจินตหรา ชัยจิตร
นางสาวพรภัทร อนุศิริ
นางสาวอุษาคเณย์ ลิ่มสุวรรณ์

ตรพ.
เลขทะเบียน 117246
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b 123434A1
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON GENETIC DIVERSITY AND TISSUE CULTURE IN *Passiflora* sp.

MISS JINTARA CHAIYAJIT

MISS PORNPAT ANUSIRI

MISS USAKANAE LIMSUWAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชสกุล *Passiflora*

Study on genetic diversity and tissue culture in *Passiflora* sp.

ชื่อนักศึกษา	นางสาวจินตหรา	ชัยจิตร	50050698
	นางสาวพรภัทร	อนุศิริ	50050744
	นางสาวอุษาคเณย์	ลิ่มสุวรรณ์	50050789

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม (ประธานกรรมการ)	
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม (กรรมการ)	
อาจารย์ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ (กรรมการ)	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในพืชสกุล *Passiflora*	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจินตหรา	ชัยจิตร
	นางสาวพรภัทร	อนุศิริ
	นางสาวอุษาคเณย์	ลิ่มสุวรรณ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
ปีการศึกษา	2553	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์	โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ทัศนารถ	กระจ่างวุฒิ

บทคัดย่อ

Passiflora เป็นพืชสกุลหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างมาก จากการศึกษาพืชสกุลนี้ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะส่วนของใบสามารถแบ่งกลุ่มตามรูปร่างของใบ ขอบใบ ปลายใบ และโคนใบ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ ITS ที่อยู่บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้นั้นประมาณ 650 คู่เบส และพบว่ามีเพียง 8 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากตัวอย่าง 26 สายพันธุ์ ที่สกัดดีเอ็นเอได้ นำตัวอย่างทั้ง 8 สายพันธุ์มาวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยโปรแกรม ClustalX ร่วมกับข้อมูลลำดับเบสของพืชสายพันธุ์นี้ในฐานข้อมูล GenBank โดยแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้นได้จัดจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้ออกเป็นกลุ่มร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปร่างใบ ในการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Passiflora* พันธุ์ลูกผสม พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำลำต้นเสาวรสให้เจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้น 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ส่วนใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้น BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มืด การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยพบว่า เซลล์จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 18 หลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : *Passiflora*, สัณฐานวิทยา, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Title	Study on genetic diversity and tissue culture in *Passiflora* sp.
Students	Miss Jintara Chaiyajit
	Miss Pornpat Anusiri
	Miss Usakanae Limsuwan
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2010
Advisor	Asst.Prof. Dr Anurug Poeaim
Co-Advisor	Tasaanart Krajangwut

ABSTRACT

Passiflora is an economically important genus that shows great phenotypic variation. In the present study, the 40 *Passiflora* shows a wide range of variation in their leaf morphology (leaf shapes and sizes, leaf margins, leaf apices and leaf bases). Analysis of genetic variation in the internal transcribed spacers (ITS) regions of ribosomal DNA (rDNA) using the specific primers. A single DNA band of approximately 650 bp was amplified from each species. However, those primers amplify reproducible products only 8 from 26 samples. Eight sequences were aligned using the ClustalX program and compared with public sequences available in the GenBank database. In the construction of phylogenetic trees from DNA sequence data show four distinct divisions corresponds with leaf shape. Study on the tissue culture for *Passiflora*, Callus were induced from stem on MS medium supplemented with 5 mg/l of 2,4-D under light. Callus were induced from leaf under the culture on media contain 0.5 mg/l of BA under the darkness. As studied cell suspension growth rate, we found that the maximum growth rate is after 18 days of culture.

Keywords: *Passiflora*, morphological, genetic diversity, tissue culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ และผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการในโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษ ตลอดจนคอยดูแลและให้ความช่วยเหลือจนกระทั่งโครงงานนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงานพิเศษที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำในส่วนของพรรณพืชแก่คณะผู้จัดทำ

ขอขอบพระคุณพระตำหนักสวนปทุม ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพรรณพืชเพื่อนำมาใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณทุกกำลังใจ ทุกความช่วยเหลือที่เป็นแรงผลักดันให้งานในครั้งนี้ประสบผลสำเร็จ

นางสาวจินตหรา ชัยจิตร
นางสาวพรภัทร อนุศิริ
นางสาวอุษาคเณย์ ลิ่มสุวรรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VII

สารบัญรูป VIII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของงานโครงงานพิเศษ 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยว 4

2.1 ข้อมูลทั่วไปของ *Passiflora* 4

2.1.1 การจัดจำแนก 5

2.1.2 นิเวศวิทยา 5

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช 7

2.2.1 ใบ 7

2.2.1.1 ก้านใบ 7

2.2.1.2 หูใบ 7

2.2.1.3 แผ่นใบ 8

2.2.2 ชนิดของใบ 15

2.2.3 การเรียงตัวของใบบนลำต้น 15

2.2.4 ดอก 16

2.3 การประยุกต์ใช้ 18

2.3.1 ดอก 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.2 ผล	18
2.3.3 ใช้เป็นยาและรักษาอาการโรคประสาท	19
2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	20
2.4.1 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	20
2.4.2 องค์ประกอบของอาหาร	21
2.5 หลักการสกัดดีเอ็นเอ	22
2.6 เทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR)	23
2.6.1 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส	23
2.6.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาพีซีอาร์	24
2.7 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis of DNA)	25
2.7.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส	26
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	29
3.1 สารเคมี	29
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	29
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง	30
3.3.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	30
3.3.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	30
3.3.1.2 การศึกษาในระดับโมเลกุล	32
3.3.1.2.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับสกัดดีเอ็นเอ	32
3.3.1.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ	32
3.3.1.2.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ	32
3.3.1.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	33
3.3.1.2.5 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	34
3.3.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	35
3.3.2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเนื้อเยื่อลำต้นและใบให้เจริญเป็นแคลลัส	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย	36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	37
4.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	37
4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	37
4.1.2 การศึกษาในระดับโมเลกุล	43
4.1.2.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ	43
4.1.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	44
4.1.2.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora*	45
4.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	48
4.2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเนื้อเยื่อลำต้นและใบให้เจริญเป็นแคลลัส	48
4.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย	59
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	62
เอกสารอ้างอิง	64
ภาคผนวก ก	67
ภาคผนวก ข	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	รหัสและรายชื่อของตัวอย่างพืชสกุล *Passiflora* ที่ใช้ศึกษาจำนวน 40 สายพันธุ์	31
3.2	สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบในเทคนิคพีซีอาร์	34
3.3	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	34
4.1	การจัดจำแนกตามลักษณะของรูปร่างใบ	39
4.2	การจัดจำแนกตามลักษณะปลายใบ	41
4.3	การจัดจำแนกตามลักษณะขอบใบ	42
4.4	การจัดจำแนกตามลักษณะโคนใบ	43
4.5	ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ของตัวอย่าง 12 สายพันธุ์	44
4.6	ร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อลำต้นและใบในสภาวะที่มีแสง บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์	50
4.7	ร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อลำต้นและใบในสภาวะที่มืด บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์	55
4.8	ค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงลักษณะใบของ ก. *Passiflora pardifolia* และ ข. *Passiflora yucatanensis*	4
2.2	แสดงลักษณะดอกชนิดต่าง ๆ ของในสกุล *Passiflora*	6
2.3	แสดงลักษณะหูใบในพืชชนิดต่าง ๆ	8
2.4	แสดงลักษณะรูปร่างแผ่นใบในพืชชนิดต่าง ๆ	10
2.5	แสดงลักษณะปลายใบในพืชชนิดต่าง ๆ	11
2.6	แสดงลักษณะโคนใบในพืชชนิดต่าง ๆ	12
2.7	แสดงลักษณะขอบใบในพืชชนิดต่าง ๆ	13
2.8	แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใบ	14
2.9	แสดงลักษณะใบเดี่ยวและใบประกอบในพืชชนิดต่าง ๆ	15
2.10	แสดงลักษณะการเรียงตัวของใบบนกิ่งหรือลำต้น	16
2.11	แสดงองค์ประกอบของดอกแต่ละชั้นของดอกเอมะซอน (ซ้าย) ที่ดึงกลับดอกออก 1 กลีบ และดอกส้าน (ขวา)	17
2.12	แสดงลักษณะของดอกเพศผู้ (ซ้าย) และดอกเพศเมีย (ขวา)	18
2.13	แสดงหลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	24
4.1	แสดงรูปร่างใบสองแฉกในกลุ่มที่ 3 ก. *P. micropetala* ข. *P. fledermouse* และ ค. *P. capsularis*	40
4.2	แสดงรูปร่างใบแบบเรียวยาวด้านข้างในกลุ่มที่ 4 ก. *P. sexocellata* และ ข. *P. coriacea*	40
4.3	แสดงรูปร่างใบเป็นแบบรูปไข่ในกลุ่มที่ 6 ก. *P. laurifolia* และ ข. *P. dispar*	40
4.4	แสดงรูปร่างใบแบบรูปเกี่ยงใบหอกในกลุ่มที่ 11 *P. amthystina* 'Cardoso Moreira'	41
4.5	แสดงผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในบริเวณ ITS	45
4.6	แสดงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ตำแหน่ง ITS บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) พร้อมแสดงค่า bootstrapping value ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชุดข้อมูลซ้ำ 1000 ครั้ง และจัดจำแนกกลุ่มร่วมกับลักษณะรูปร่างของใบสามารถจำแนกออกได้เป็น 4 กลุ่ม	47
4.7	แสดงลักษณะลำต้นที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีแสง	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.8	แสดงลักษณะใบที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในสภาวะที่มีแสง	52
4.9	แสดงลักษณะลำต้นที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในสภาวะที่มีแสง	53
4.10	แสดงลักษณะใบที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในสภาวะที่มีแสง	54
4.11	แสดงลักษณะลำต้นที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มืด	56
4.12	แสดงลักษณะใบที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในสภาวะที่มืด	57
4.13	แสดงลักษณะลำต้นที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในสภาวะที่มืด	58
4.14	แสดงลักษณะใบที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในสภาวะที่มืด	59
4.15	แสดงกราฟระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของแคลลัส *Passiflora* โดยวิธีการหาน้ำหนักสด	61
4.16	แสดงกราฟระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของแคลลัส *Passiflora* โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

Passiflora จัดอยู่ในวงศ์ Passifloraceae ปัจจุบันจัดอยู่ในอันดับ Malpighiales พืชวงศ์นี้มีความหลากหลายมาก ประกอบด้วย 18 สกุล ประมาณ 630 สายพันธุ์ โดยสกุล *Passiflora* ประกอบไปด้วย 21 สกุลย่อย และมีมากกว่า 500 สายพันธุ์ มีการแพร่กระจายอยู่ตามบริเวณเขตร้อนและกึ่งร้อน โดยทั่วไปเรียกว่าดอกแพสชั่น (passion flower) ซึ่งดอกแพสชั่นนี้ได้ใช้เป็นต้นไม้ประดับ เนื่องจากดอกมีความสวยงามและใบมีความหลากหลาย เป็นที่รู้จักกันมาเป็นเวลานานราวปี 1625 ในศตวรรษที่ 17 ชาวยุโรปได้นำมาใช้ประดับสวน (Abreu และคณะ, 2009) สกุล *Passiflora* ประมาณ 460 สายพันธุ์ได้มีการอธิบายไว้แล้ว จากจำนวนเหล่านี้ประมาณร้อยละ 90 มีต้นกำเนิดในอเมริกา และมีความใกล้ชิดกับ 150 สายพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศบราซิล บางสายพันธุ์มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยมีคุณลักษณะเป็นผลไม้สำหรับบริโภค และมีคุณสมบัติเป็นยา (Sousa และ Meletti, 1997) เช่น *P. edulis* มีปลูกกันอย่างแพร่หลายในแถบเมดิเตอร์เรเนียน ทางตอนใต้ของรัฐฟลอริดาและแอฟริกาใต้ ซึ่งผลจะใช้เป็นแหล่งของน้ำผลไม้สำหรับบริโภค นอกจากนั้นยังสามารถนำมาใช้เป็นยาโดยส่วนใบและรากของ *P. incarnata* พบว่ามีประวัติการใช้มายาวนานในพวกชนพื้นเมืองของอเมริกัน ได้นำเอาใบสดและแห้งมาชงเป็นน้ำชาเพื่อรักษาอาหารนอนไม่หลับ โรคลมบ้าหมู และอาการปวดต่างๆ นอกจากนี้ทางตอนกลางของอเมริกาใต้ยังได้นำเอาใบของ *P. edulis* และบางสปีชีส์มาใช้เป็นยาสูบด้วย ชนพื้นเมืองของอเมริกัน พวกแอซเทคและมายา ได้ใช้ *Passiflora* เป็นยารักษาอาการเจ็บปวดและอาการไข้ ซึ่งยังคงใช้ต่อเนื่องกันมาจนถึงทุกวันนี้ (http://www.passionflow.co.uk/ passiflora-passion-flower-virus.htm)

Passiflora มีลักษณะของดอกที่โดดเด่นหลากหลายแบบ รวมทั้งจะมีชั้นของมงกุฎหรือกระบังรอบที่มีสีสดใสเพิ่มขึ้นมา มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฝาปิด (operculum) หลายแบบ มีก้านชูเกสรร่วมและมีฐานดอกที่ซับซ้อน สำหรับส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์คือ มีรูปร่างของใบแตกต่างกันมาก และมีความผันแปรของชนิดฐานดอกภายนอกสูง ไม่ว่าจะเป็นใบ ลำต้น ใบประดับ และก้านใบ (Krosnick และ Freudenstein, 2005) *Passiflora* มีวัตถุประสงค์ในการเพาะปลูกเพื่อใช้เป็นไม้ประดับและสร้างลูกผสมจากต้นพืชต่างสายพันธุ์ ดังนั้นในปี 2003 จึงได้มีลูกผสมเพิ่มขึ้นมากกว่า 300 สายพันธุ์ และมีการเพาะปลูกจนได้เป็นต้นพืชด้วย เพราะฉะนั้นความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของพืชกลุ่มนี้จึงมีเพิ่มขึ้น เนื่องจากความหลากหลายทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัณฐานวิทยาที่เพิ่มขึ้นเหล่านี้ จึงได้มีการหาความผันแปรทางพันธุกรรม เพื่อยืนยันการจัดจำแนกสกุลใหม่ (Muschner และคณะ, 2006) วิธี phylogenetic สามารถใช้สร้าง haplotype tree ซึ่งจะบ่งบอกความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการของยีนในกลุ่มประชากรหรือสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับโครงสร้างทางภูมิศาสตร์ของข้อมูล สามารถอ้างถึงรูปแบบลำดับวิวัฒนาการส่วนย่อยของประชากรได้ (Mäder และคณะ, 2010)

บริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) เป็นบริเวณลำดับดีเอ็นเอ ที่ถูกนำมาใช้เป็นแบบสำหรับหาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลในระดับสายพันธุ์ เช่น จำแนกสายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์ เนื่องจาก ITS เป็นบริเวณที่มีระดับความผันแปรมากกว่าบริเวณอื่น ๆ ของอาร์ดีเอ็นเอ (nuclear ribosomal RNA) โดยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เป็นไพรเมอร์มาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมากที่สุด (http://www.biology. duke. edu/fungi/mycolab/primers.htm) การศึกษาลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชสกุล *Passiflora* โดยวิธีพีซีอาร์ อาร์เอพีดี (Random amplification of polymorphic DNA) ทำให้เกิดรูปแบบลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธ์ได้ และเป็นวิธีที่ง่ายต่อการจำแนกเพื่อใช้ปรับปรุงความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือประชากร รวมทั้งเป็นวิธีที่รวดเร็วและเป็นวิธีการที่ราคาไม่แพง (Crochemore และคณะ, 2003)

Passiflora caerulea ได้นำมาใช้เป็นยาระงับประสาทอย่างแพร่หลายในประเทศอาร์เจนตินา วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงถูกนำมาใช้เพื่อขยายพันธุ์และเพาะเลี้ยงในระดับการค้า เพื่อจำแนกเอาสารที่มีคุณสมบัติทางเคมีนั้น การนำเอาเนื้อเยื่อส่วนใบมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and skoog) ซึ่งประกอบด้วยฮอร์โมน 6-benzylamino-purine (BA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นพืชโดยตรงได้ (Busilacchi และคณะ, 2008)

การใช้ความเข้มข้นของฮอร์โมน BA แตกต่างกันสามารถชักนำให้เกิดตาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ ราก และต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อได้ ซึ่งเนื้อเยื่อเหล่านี้ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของ *Passiflora cincinnata* โดยที่ความเข้มข้นของ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดตา (Lombardi และคณะ, 2007)

ต้นพืชที่ไม่เหมาะสมและไม่สมบูรณ์จะขัดขวางผลผลิตของสายพันธุ์ *Passiflora edulis* ผลของการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดทำให้ผลลัพธ์ที่ได้ไม่เป็นที่ต้องการและไม่เป็นไปตามฤดูกาล (Isutsa, 2004) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบของ *Passiflora edulis* ในอาหารสูตร MS ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลต่อลิตร และ indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถสร้างยอดแรกเกิดได้จำนวนมาก ซึ่งยอดแรกเกิดเหล่านี้ถ้าย้ายลงในอาหารใหม่ที่มีความเข้มข้นของ BA ลดลงต่อไปเรื่อย ๆ สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ (Kawata และคณะ, 1995)

เอกสารนี้เป็นการเผยแพร่ผลงานเพื่อใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากคุณสมบัติต่างๆและลักษณะที่หลากหลายของ *Passiflora* จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในพืชสกุล *Passiflora* ไม่ว่าจะเป็นลักษณะลำต้น ใบ ดอก และลักษณะภายนอกอื่น ๆ ที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน และพบว่าบางสายพันธุ์มีลักษณะใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างด้วยสายตาได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับยีน เพื่อให้ง่ายต่อการจัดจำแนกสายพันธุ์และดูความแตกต่างทางพันธุกรรม จากความนิยมในการบริโภค *Passiflora* กันอย่างแพร่หลายทั้งในรูปของผลไม้และแปรรูปในอุตสาหกรรมจำนวนมาก รวมไปถึงการนำ *Passiflora* ไปปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ เพื่อเพิ่มผลผลิตของ *Passiflora* จึงได้ทำการศึกษาอาหารที่เหมาะสมไปเพาะเลี้ยงต้นพืช เพื่อให้พืชเจริญเติบโตได้ดี สามารถนำไปแพร่ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต่อไปได้ง่าย หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านพันธุวิศวกรรมปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชสกุล *Passiflora* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุล

1.2.2 เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเนื้อเยื่อลำต้น และใบให้เจริญเป็นแคลัส

1.2.3 เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส

1.2.4 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการศึกษาดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาและหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Passiflora* ว่ามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมของแต่ละสายพันธุ์มากน้อยเพียงใดด้วยเทคนิค PCR ในบริเวณ ITS พร้อมกับทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลนี้และหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแต่ละสายพันธุ์ให้เจริญไปเป็นแคลลัส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Passiflora* ในอนาคต
2. เป็นแนวทางในการนำไปใช้เพื่อการขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนผลผลิตให้มากยิ่งขึ้นในเวลาอันรวดเร็ว
3. เป็นแหล่งความรู้ในการพัฒนาผลผลิตทางด้านการเกษตร
4. ทราบข้อมูลในการจำแนกสายพันธุ์ของพืชสกุล *Passiflora*
5. ทราบข้อมูลในการเพาะเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของ *Passiflora* (http://en.wikipedia.org/wiki/Passion_flower. 1 ตุลาคม 2553)

พืชสกุล *Passiflora* (เสาวรส) หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า กะทกรกฝรั่ง มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Passion Fruit เป็นไม้ผลที่อยู่ในวงศ์ Passifloraceae และอยู่ในสกุล *Passiflora* มีประมาณ 500 สายพันธุ์ ลักษณะเป็นต้นไม้เลื้อยฤดูเดียว และลักษณะเป็นไม้ต้นอยู่ใน สกุลย่อย Astrophea ใบในแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะที่หลากหลายแสดงดังรูปที่ 2.1 ก. และ ข. เช่น ใบลักษณะรูปไข่ กว้าง มีรูปร่างเว้า ปลายใบมีเส้นขน หรือมีเส้นขนอ่อนนุ่มปกคลุมใบ ส่วนใหญ่มักมีต่อมบนใบ



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะใบของ ก. *Passiflora pardifolia* และ ข. *Passiflora yucatanensis*
ที่มา : คณะผู้จัดทำ ถ่ายภาพที่สวนปทุม (2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 การจัดจำแนก (http://en.wikipedia.org/wiki/Passion_flower. 1 ตุลาคม 2553)

Passiflora ถูกจัดจำแนกตามหลักวิทยาศาสตร์ได้ดังนี้

อาณาจักร : Plantae

หมวด : Magnoliophyta

ชั้น : Magnoliopsida

ชั้นย่อย : Rosidae

อันดับ : Malpighiales

วงศ์ : Passifloraceae

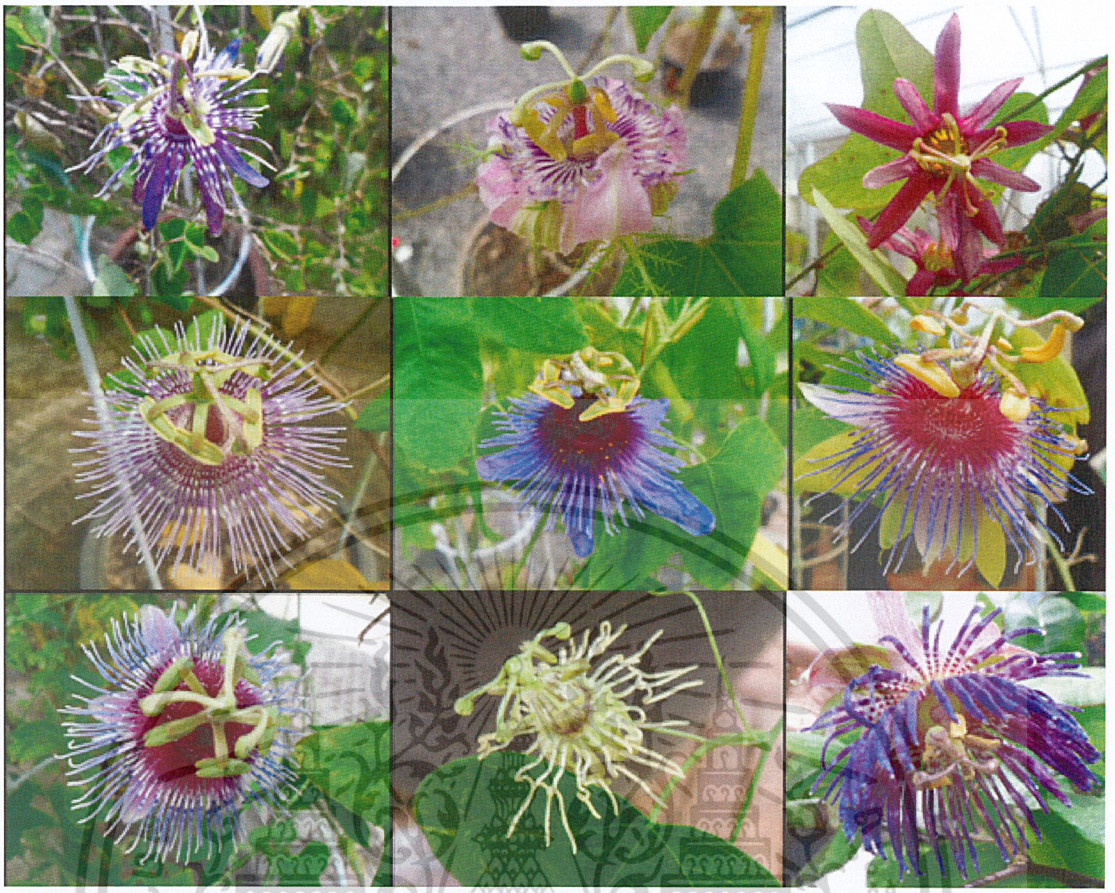
สกุล : *Passiflora* L.

วงศ์ Passifloraceae พบอยู่ทั่วโลกยกเว้นบริเวณขั้วโลกใต้ และสกุล *Passiflora* ก็ไม่ได้มาจากทวีปแอฟริกาแม้ว่าจะมีหลายสายพันธุ์ของพืชวงศ์นี้ที่พบที่นั่น เช่น *Plesiomorphic Adenia* พบว่ามีสกุล *Passiflora* 9 สายพันธุ์ที่เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศสหรัฐอเมริกา พบในตอนเหนือของรัฐโอไฮโอ ทางตะวันตกของรัฐแคลิฟอร์เนีย และทางใต้ของรัฐฟลอริดา ส่วนสายพันธุ์อื่น ๆ พบมากที่สุดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ จีน ทางใต้ของทวีปเอเชียและเกาะนิวกินี พบ 4 สายพันธุ์ในประเทศออสเตรเลียและสายพันธุ์เดียวที่เป็นพันธุ์เฉพาะถิ่นของประเทศนิวซีแลนด์ สายพันธุ์ที่ค้นพบต่อมา เช่น *P. pardifolia* และ *P. xishuangbannaensis* พบในปี 2005 และ 2006 ตามลำดับ *Passiflora* หลายสายพันธุ์ที่มีการผสมข้ามสายพันธุ์กันทำให้ได้ลักษณะที่ห่างไกลจากต้นเดิม เช่น ต้นที่มีดอกสีน้ำเงิน *P. caerulea* พบในป่าของสเปน ต้นที่ให้ผลสีม่วง *P.edulis* และผลสีเหลือง *P. flavicarpa* ปลูกเป็นพืชให้ผลทางการค้าในเขตร้อน

2.1.2 นิเวศวิทยา (http://en.wikipedia.org/wiki/Passion_flower. 1 ตุลาคม 2553)

ดอกของ *Passiflora* เป็นไม้ประดับที่มีความสวยงาม (รูปที่ 2.2) มีโครงสร้างที่เป็นลักษณะเฉพาะ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ดึงดูดให้พวกผึ้งเข้ามาช่วยผสมเกสร ในเขตร้อนของประเทศอเมริกาจะตั้งคานไม้ไว้ใกล้กับต้น *Passiflora* เพื่อกระตุ้นให้ผึ้งมาสร้างรัง ดอก *Passiflora* บางสายพันธุ์มีขนาดและโครงสร้างเหมาะที่จะให้นกแฮมมิ่ง ผึ้ง ตัวต่อหรือค้างคาวมาช่วยในการผสมเกสรในขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ ผสมเกสรกันเองได้ เกสรของดอกที่มีสีเหลืองจะเห็นเด่นชัดว่าผึ้งที่มีลักษณะผิดปกติจะมากัดกิน แต่อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้วผึ้งจะมาผสมเกสรไม่ได้ทำลายดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะดอกชนิดต่าง ๆ ของในสกุล *Passiflora*
ที่มา : คณะผู้จัดทำ ถ่ายภาพที่สวนปทุม(2553)

Passiflora เป็นแหล่งน้ำหวานที่สำคัญของแมลงหลายชนิด ส่วนใบถูกใช้เป็นอาหารของนกและหนอนผีเสื้อ เช่น ใบของ *Passiflora lutea* หนอนผีเสื้อบางชนิดจะชอบเพราะมีพิษสามารถช่วยป้องกันศัตรูที่จะฆ่ามันได้ บางสายพันธุ์ที่ใบมีตุ่มเล็ก ๆ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับไข่ผีเสื้อทำให้ผีเสื้อไม่มาวางไข่ได้อีก มีอีกหลายสายพันธุ์ที่ผลิตน้ำหวานจากต่อมบนก้านใบซึ่งน้ำหวานนี้จะป้องกันพวกมดและศัตรูพืชต่าง ๆ

ใบประดับมีกลิ่นเหม็นถูกปกคลุมไปด้วยขนซึ่งมีน้ำเหนียว ๆ ซึมออกมา เมื่อมีแมลงตัวเล็ก ๆ จำนวนมากมาติดกับสารเหนียวนี้จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสและฟอสฟาเทส ซึ่งแมลงที่ถูกฆ่าส่วนใหญ่เป็นศัตรูพืช ดังนั้นต้น *Passiflora* จึงเปรียบเสมือนเป็นต้นไม้กินแมลง

ต้น *Passiflora* ที่เรียกว่าบานาน่าหรือบานาน่า โปคา (*P. tarminiana*) มีต้นกำเนิดมาจากตอนกลางของประเทศบราซิล เป็นวัชพืชที่มีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะบนหมู่เกาะฮาวาย ตามปกติแพร่กระจายโดยหมูป่าที่กินผลเข้าไป ซึ่งจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและขึ้นปกคลุมพืชที่อยู่บริเวณนั้นโดยเฉพาะตามริมถนน *Passiflora* ที่มีสีน้ำเงิน (*P. caerulea*) อยู่ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครอบครองของประเทศสเปนและน่าจะต้องเฝ้าระวังเพื่อทำให้แพร่กระจายน้อยลง ในทางกลับกัน บางสายพันธุ์กำลังสูญพันธุ์ เช่น *P. pinnatistipula* ซึ่งหาได้ยาก พบว่ามีการเจริญในเทือกเขาแอนดีซจากประเทศเวเนซูเอลาถึงประเทศชิลี ที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล 2,500 – 3,800 เมตร และตามชายฝั่งของประเทศชิลี พบว่า *Passiflora* บานาน่าและ *P. mixta* มีกลีบดอกเป็นสีแดงสดใส การเกิดโรคใน *Passiflora* ทางเศรษฐกิจเกิดจากพวกราสกุล *Septoria*

ในประเทศไทยพบสายพันธุ์ของ *Passilfora* อยู่ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *P. foetida, P. siamiea* และ *P. paerakensis*

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช (ชุมพล คุณวาสี, 2551)

การจำแนกทางสัณฐานวิทยาจะสังเกตจากลักษณะภายนอกของต้นด้วยตา ซึ่งแบ่งการจำแนกได้หลายส่วน ดังนี้

2.2.1 ใบ

ใบเป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช เกิดทางด้านข้างของลำต้นบริเวณส่วนที่เป็นข้อ ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่าแผ่นใบและก้านใบ อาจมีหรือไม่มีหูใบ

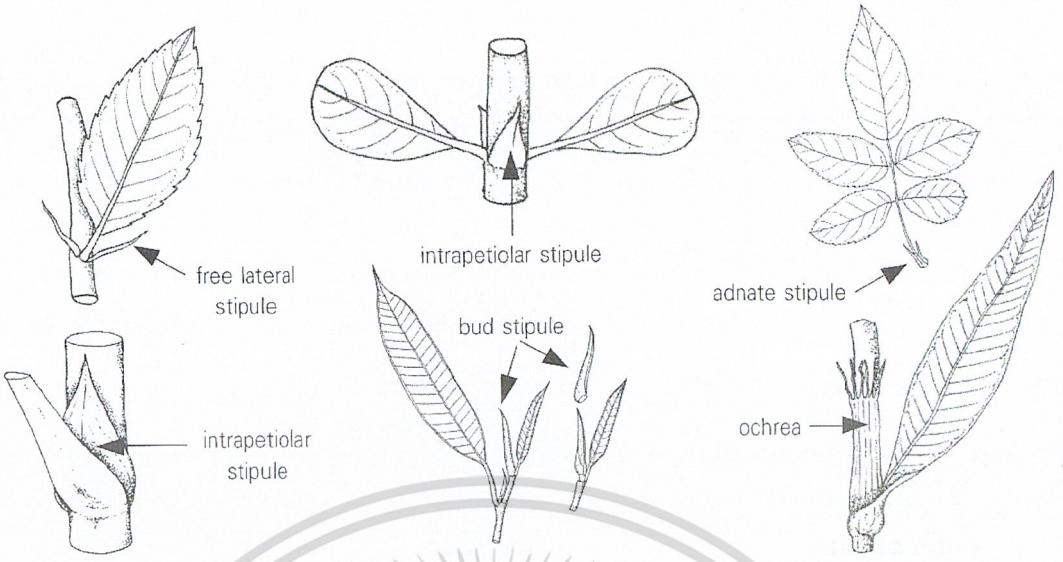
2.2.1.1 ก้านใบ

ก้านใบคือส่วนที่เป็นแกนที่ยึดแผ่นใบกับลำต้นหรือกิ่ง ใบพืชที่มีก้านใบเรียกว่า “เพทิโอเลท ลีฟ” ส่วนใบพืชบางชนิดอาจไม่มีก้านใบเรียกว่า “เซสเซล ลีฟ” ลักษณะเป็นรูปแท่งหรือทรงกระบอก มีความสั้นยาว และขนาดแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด เช่น ก้านที่แผ่ออกไปเป็นแผ่นคล้ายปีก เช่น ก้านใบมะกรูด หรือก้านใบอาจจะพองออกคล้ายเป็นกระเปาะทำหน้าที่คล้ายเป็นทุ่น เช่น ผักตบชวา ในพืชบางชนิด เช่น กระถินณรงค์ ก้านใบจะแผ่ออกเป็นแผ่นมีลักษณะคล้ายแผ่นใบ ทำหน้าที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้

2.2.1.2 หูใบ

หูใบเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายใบขนาดเล็ก มักมีสีเขียว อาจพบอยู่ที่บริเวณโคนก้านใบ หรือติดอยู่ที่ลำต้นหรือกิ่งในตำแหน่งที่ตรงกับโคนก้านใบ มีรูปร่าง ขนาด และตำแหน่งที่แตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด (รูปที่ 2.3) หรืออาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นหนามหรือต่อม หูใบพบได้บ่อยในพืชใบเลี้ยงคู่ ใบพืชที่มีหูใบเรียก “สติกพูเลท ลีฟ”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะหูใบในพืชชนิดต่าง ๆ
ที่มา : ชุมพล คุณวาสี (2551)

2.2.1.3 แผ่นใบ

แผ่นใบคือส่วนที่มีลักษณะเป็นแผ่นแบนของใบ เป็นบริเวณที่มีการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้น มีเนื้อเยื่อท่อลำเลียงกระจายอยู่ทั่วไป เนื้อเยื่อท่อลำเลียงของก้านใบมักมีขนาดใหญ่หรือเด่นชัดเรียกเส้นกลางใบ และจะมีกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงที่แยกออกจากเส้นกลางใบออกไปมีขนาดเล็กกว่าเรียกเส้นแขนงใบ ส่วนกลุ่มเนื้อเยื่อท่อแยกออกจากเส้นแขนงใบอีกทีหนึ่งจะเรียกเส้นใบย่อย

ซึ่งลักษณะสัณฐานของแผ่นใบยังแบ่งการสังเกตออกได้อีก เนื่องจากว่าทำให้เกิดความหลากหลายของรูปร่างลักษณะของใบมากมาย เป็นลักษณะที่มีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการจัดจำแนกและจัดหมวดหมู่ของพืช ดังนี้

1) รูปร่างแผ่นใบ

รูปร่างของแผ่นใบอาจแบ่งออกอย่างกว้าง ๆ ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ โดยดูตำแหน่งของส่วนที่กว้างที่สุดของแผ่นใบว่าอยู่ที่ตำแหน่งใด (รูปที่ 2.4) ตัวอย่างของรูปร่างแผ่นใบที่พบบ่อย ๆ เช่น

รูปไข่ (Ovate) มีรูปร่างแผ่นใบคล้ายรูปไข่ มีส่วนกว้างที่สุดอยู่บริเวณโคนใบ ขอบใบโค้ง มีอัตราส่วนของความกว้างต่อความยาวประมาณ 1 : 2 ถึง 2 : 3

รูปใบหอก (Lanceolate) มีรูปร่างแผ่นใบคล้ายรูปใบหอก ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณโคนใบหรือเหนือโคนใบขึ้นมาเล็กน้อย ขอบใบโค้ง มีความยาวมากกว่าความกว้างมาก อัตราส่วนของความกว้างต่อความยาวประมาณ 1 : 5 ถึง 1 : 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปหัวใจ (Cordate) มีรูปร่างแผ่นคล้ายรูปหัวใจ มีลักษณะของเส้นรอบรูปคล้ายแผ่นใบรูปไข่ แต่มีลักษณะเด่นอยู่ที่ส่วนฐานใบที่หยักเว้าคล้ายรูปหัวใจ และส่วนฐานใบทั้งสองข้างของรอบหยักเว้ามีลักษณะกลมมน

รูปสามเหลี่ยม (Deltoid) มีรูปร่างแผ่นใบเป็นรูปสามเหลี่ยม ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณโคนใบ ซึ่งมีลักษณะฐานตัดตรงหรือค่อนข้างตรง ขอบใบมักจะสอบขึ้นไปหาปลายใบ ทำให้เส้นรอบรูปของแผ่นใบอยู่ในรูปทรงสามเหลี่ยม

รูปไต (Reniform) มีรูปร่างแผ่นใบคล้ายรูปไต มีส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ที่ปลายใบ โคนใบมักหยักเว้าเล็กน้อย ขอบใบมักจะโค้งมนไปบรรจบกัน ทำให้เส้นรอบรูปของแผ่นใบมีลักษณะคล้ายรูปไต หรือเมล็ดถั่ว

รูปไข่กลับ (Obovate) มีรูปร่างแผ่นใบคล้ายรูปไข่กลับ มีส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณปลายใบ ขอบใบโค้ง มีอัตราส่วนของความกว้างต่อความยาวประมาณ 1 : 2 ถึง 2 : 3

รูปใบหอกกลับ (Oblanceolate) มีรูปร่างแผ่นใบคล้ายรูปใบหอกกลับ ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ที่บริเวณปลายใบ ขอบใบโค้ง มีความยาวมากกว่าความกว้างมาก

รูปสามเหลี่ยมกลับ (Obdeltiod) มีรูปร่างแผ่นใบเป็นรูปสามเหลี่ยมกลับ ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณปลายใบซึ่งมีลักษณะตัดตรงหรือค่อนข้างตรง ขอบใบมันจะสอบเข้าไปหาโคนใบ ทำให้เส้นรอบรูปของแผ่นใบอยู่ในรูปทรงสามเหลี่ยมกลับ

รูปช้อน (Spathulate) มีรูปร่างแผ่นใบคล้ายรูปช้อน มีส่วนกว้างสุดอยู่ที่บริเวณปลายใบแล้วขอบใบจะคอดแคบเรียวเข้าหาเส้นกลางใบไปสู่ส่วนโคนใบ

รูปรี (Elliptic) รูปร่างแผ่นใบรูปรี ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ที่บริเวณกึ่งกลางของแผ่นใบ ขอบใบโค้ง

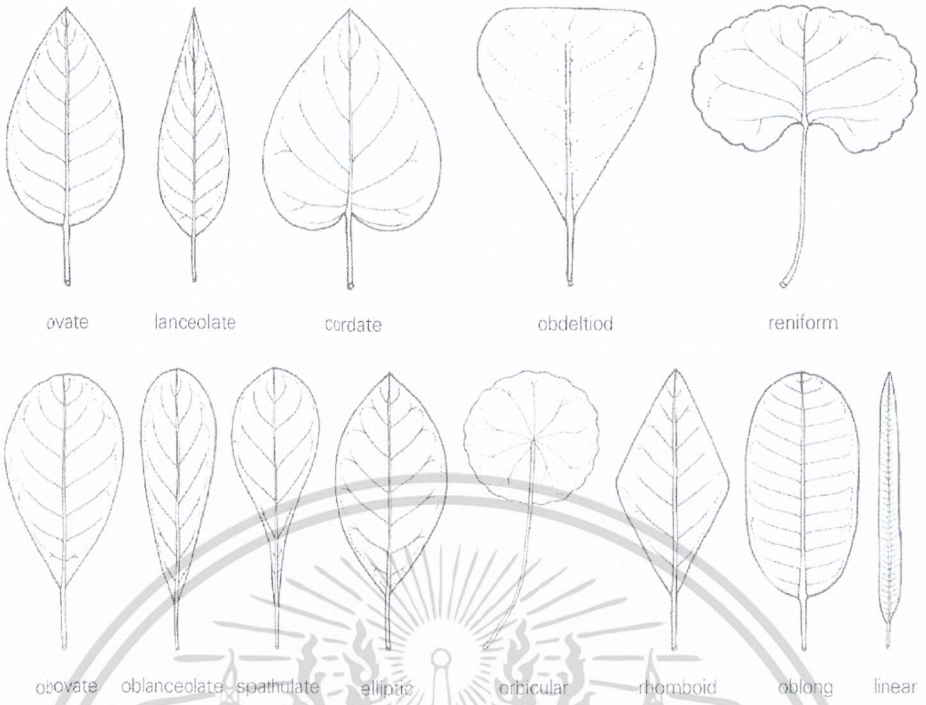
รูปกลม (Orbicular) มีรูปร่างแผ่นใบรูปทรงกลม ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณกึ่งกลาง ขอบใบโค้ง

รูปสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด (Rhomboid) มีรูปร่างแผ่นใบรูปข้าวหลามตัด ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณกึ่งกลางใบ ขอบใบค่อนข้างตัดตรงและทำมุม

รูปขอบขนาน (Oblong) มีรูปร่างแผ่นใบรูปขอบขนาน ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ที่บริเวณกึ่งกลางของแผ่นใบ และมีขอบใบที่ขนานกัน

รูปแถบ (Linear) มีรูปร่างแผ่นใบรูปแถบ มีลักษณะคล้ายรูปร่างแผ่นใบแบบรูปขอบขนาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะรูปร่างแผ่นใบในพืชชนิดต่าง ๆ

ที่มา : ชุมพล คุณวาสี (2551)

2) ปลายใบ

ลักษณะปลายใบมีความแตกต่างกันมากมาย (รูปที่ 2.5) ลักษณะที่พบได้บ่อย ๆ และควรรู้จัก เช่น

ปลายแหลม (Acute) ขอบใบที่มาบรรจบตรงปลายยอดมักตรงหรือโค้งมน ทำมุมน้อยกว่า 90 องศา

ปลายเรียวแหลม (Acuminate) ลักษณะคล้ายปลายแหลม แต่ขอบใบมักโค้งเว้าสอบเข้ามาตรงปลายยอด

ปลายยาวคล้ายหาง (Caudate) ปลายใบมีลักษณะเรียวยาว แคบ แต่ไม่แข็ง

ปลายแหลมเข็ม (Aristate) ปลายใบมีลักษณะเรียวแหลม แคบ ยาว และค่อนข้างแข็ง

ปลายเป็นติ่งแหลม (Cuspidate) ปลายใบที่เกิดจากขอบใบที่โค้งเว้าและสอบเข้ามาเป็นมุมแหลม สั้น และแข็ง

ปลายเป็นติ่งหนาม (Mucronate) ปลายใบที่มีลักษณะแหลมเป็นติ่งเล็ก ๆ ทำให้ดูเหมือนเป็นส่วนที่ยื่นต่อออกมาจากเส้นกลางใบ

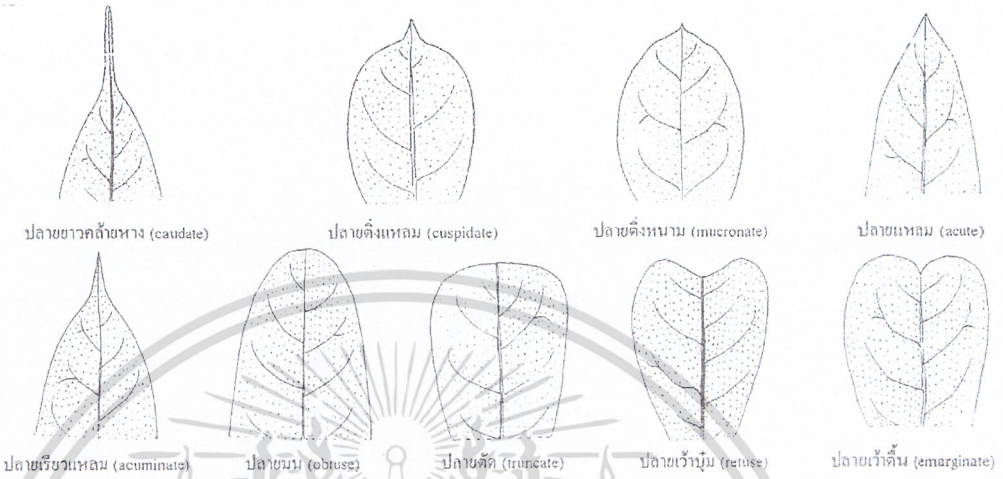
ปลายมน (Obtuse) ปลายใบโค้ง หรือมน หรืออาจมีลักษณะเป็นมุมป้าน

ปลายเว้าบุ๋ม (Retuse) ปลายใบที่มีลักษณะคล้ายกับปลายมน แต่จะเข้าเว้าเข้ามาตื้น ๆ ตรงตำแหน่งของเส้นกลางใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลายเว้าตื้น (Emarginate) ปลายใบหยักเว้าคล้ายปลายเว้นตื้น แต่จะลึกกว่าอย่างเห็นได้ชัด

ปลายตัด (Truncate) ปลายใบที่มีลักษณะตัดตรง



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะปลายใบในพืชชนิดต่าง ๆ

ที่มา : ก่องกานดา ชยามฤต (2545)

3) โคนใบ (รูปที่ 2.6)

ลักษณะของโคนใบแบบต่าง ๆ (รูปที่ 2.6) ที่ควรรู้จักกัน เช่น

โคนใบรูปแหลม (Acute)

โคนใบมน (Obtuse)

โคนใบรูปหัวใจ (Cordate) โคนใบที่หยักเว้าคล้ายรูปหัวใจ

โคนใบตัด (Truncate) โคนใบมีลักษณะตัดตรงหรือเกือบตรง

โคนใบเบี้ยว (Oblique) โคนใบที่หยักเยื้องทำให้บริเวณส่วนโคนใบไม่มีสมมาตร เกิดจากขอบใบแต่ละข้างสอบเข้ามาไม่เท่ากันหรือไม่ตรงกัน

โคนใบรูปโล่ (Peltate) ลักษณะที่ก้านใบติดอยู่ด้านล่างของแผ่นใบบริเวณที่เป็นเนื้อใบไม่ได้ติดอยู่ที่ขอบใบ

โคนใบรูปลิ่ม (Cuneate) ลักษณะโคนใบที่ขอบใบตรงและสอบเข้ามาเป็นรูปลิ่ม

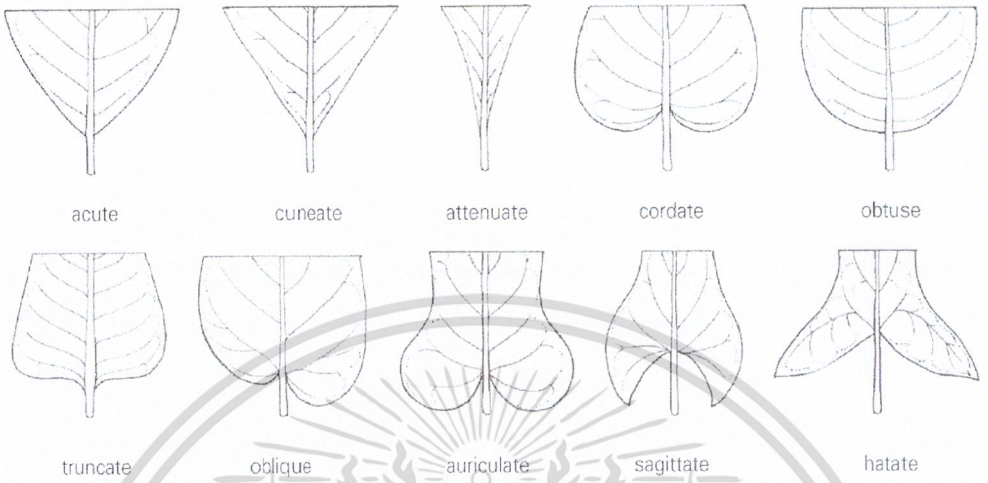
โคนใบสอบเรียว (Attenuate) ลักษณะโคนใบที่ขอบใบค่อย ๆ สอบเรียวเข้ามาหาก้านใบ

โคนใบรูปติ่งหู (Auriculate) ลักษณะโคนใบที่คล้ายรูปติ่งหู

โคนใบรูปเงี่ยงรูปศร (Sagittate) ลักษณะโคนใบแต่ละข้างจะเป็นพู ที่ปลายค่อนข้างแหลมและชี้ลง หรือชี้เข้าหาก้านใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคนใบรูปเงี่ยงใบหอก (Hatate) ส่วนปลายของพูแต่ละข้างจะชี้ออกจากก้านใบ หรือทำมุมฉากกับก้านใบ



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะโคนใบในพืชชนิดต่าง ๆ

ที่มา : ชุมพล คุณวาสี (2551)

4) ขอบใบ

ลักษณะของขอบใบแบบต่าง ๆ (รูปที่ 2.7) เช่น

ขอบเรียบ (Entire)

ขอบหยักเป็นคลื่น (Undulate) หยักเว้าเป็นคลื่นในลักษณะบนและล่างของแผ่นใบ ไม่ใช่หยักเว้าเข้าออกจากเส้นกลางใบ

ขอบจักมน (Crenate) ลักษณะขอบใบที่หยักเว้าตื้น ๆ และส่วนที่เป็นหยักมีลักษณะโค้งหรือมน ไม่แหลม

ขอบจักซี่ฟัน (Denate) ลักษณะขอบใบที่หยักเป็นฟัน ปลายของฟันชี้ออก

ขอบจักฟันเลื่อย (Serrate) ลักษณะขอบใบที่หยักเป็นฟันคล้ายขอบจักซี่ฟัน แต่ลักษณะส่วนปลายของฟันจะชี้หรือเอนขึ้นไปทางปลายยอด

ขอบหยักเว้า (Sinuate) ลักษณะของขอบใบหยักเว้าตื้น ๆ ส่วนที่เป็นหยักมีลักษณะโค้งมน ส่วนเว้าระหว่างหยักก็มีลักษณะโค้งเว้าเช่นกัน

ขอบหยักเว้าพู (Lobed) ลักษณะขอบใบที่หยักเว้าคล้ายแบบขอบหยักเว้า แต่รอบเว้าจะเกิดเข้ามาลึกเข้ามามากประมาณครึ่งหนึ่งของระยะทางระหว่างเส้นกลางใบกับขอบใบ รอยเว้ามักจะกลมหรือมน

ขอบเว้าลึก (Cleft) ลักษณะคล้ายกับขอบหยักเว้าพู แต่รอยหยักเว้าจะไม่กลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเป็นแฉก (Parted) ลักษณะขอบใบที่หยักเว้าเข้ามามากจากขอบใบลึกเข้าไปประมาณ ½ จนถึง ¾ ก่อนถึงเส้นกลางใบ

ขอบหยักลึก (Divided) ลักษณะขอบใบที่หยักเว้าเข้ามาจากขอบใบประมาณ ¾ จนเกือบถึงเส้นกลางใบ ทำให้แผ่นใบมีลักษณะคล้ายถูกแบ่งเป็นส่วน ๆ

ขอบตัดแยก (Dissected) ลักษณะขอบใบที่หยักเว้าเข้ามาจนเกือบถึงเส้นกลางใบ คล้ายแบบหยักลึก แต่จะมีลักษณะที่ละเอียดกว่า ส่วนของแผ่นใบที่ถูกแบ่งเป็นส่วนจะเล็กหรือดูละเอียดกว่า



รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะขอบใบในพืชชนิดต่าง ๆ

ที่มา : ชุมพล คุณวาสี (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) การจัดเรียงตัวของเส้นใบ

ลักษณะหรือรูปแบบของการจัดเรียงตัวของเส้นใบหรือเส้นแขนงใบ และเส้นใบย่อย (รูปที่ 2.8) ที่ปรากฏอยู่บนแผ่นใบแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

5.1 การจัดเรียงเส้นใบย่อยแบบขนาน (parallel venation) เป็นการจัดเรียงตัวของเส้นใบจำนวนมากที่ขนานกัน มีระยะห่างเท่า ๆ กัน เป็นลักษณะของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็นการเรียงเส้นใบขนานแบบขนนก (parallel pinnate venation) และการเรียงเส้นใบขนานแบบนิ้วมือ (parallel palmate venation)

5.2 การจัดเรียงเส้นใบย่อยแบบร่างแห (reticulate venation) เป็นการเรียงเส้นใบย่อยที่มีการแยกแขนงและเชื่อมต่อของเส้นใบคล้ายร่างแห เป็นรูปของเส้นใบที่พบในพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายวงศ์ แบ่งออกเป็นการเรียงเส้นใบย่อยร่างแหแบบขนนก (reticulate pinnate venation) และการเรียงเส้นใบย่อยร่างแหแบบนิ้วมือ (reticulate palmate venation)



รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใบ

ที่มา : ชุมพล คุณวาสี (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ชนิดของใบ

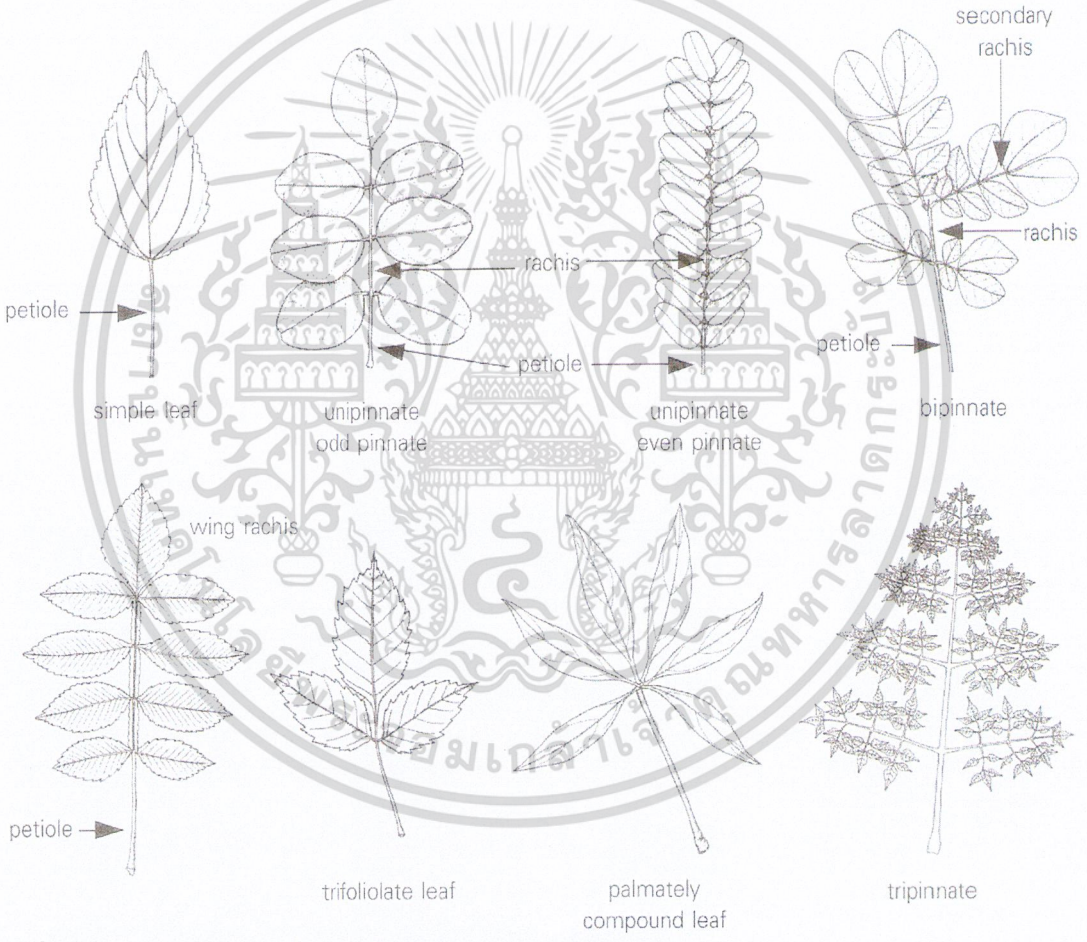
ใบอาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามจำนวนของแผ่นใบที่มีอยู่บนก้านใบ (รูปที่ 2.9) คือใบเดี่ยวและใบประกอบ

2.2.2.1 ใบเดี่ยว

ใบที่มีแผ่นใบหนึ่งแผ่นบนก้านใบและไม่รอยต่อระหว่างโคนของแผ่นใบกับก้านใบ เช่น ตำลึง ผักบุ้ง กล้วย

2.2.2.2 ใบประกอบ

ใบที่มีแผ่นใบมากกว่าหนึ่งแผ่นบนก้านใบเรียกแต่ละใบนี้ว่าใบย่อย และมีรอยต่อตรงโคนแผ่นใบกับก้านใบ



รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะใบเดี่ยวและใบประกอบในพืชชนิดต่าง ๆ

ที่มา : ชุมพล คุณวาสี (2551)

2.2.3 การเรียงตัวของใบบนลำต้น

ลักษณะการจัดระเบียบ หรือการเรียงตัวของใบบนกิ่งหรือลำต้นจะแตกต่างกันที่จำนวนใบในแต่ละข้อ และระนาบของใบบนกิ่ง (รูปที่ 2.10) แบ่งได้ 3 แบบใหญ่ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.1 แบบสลับ

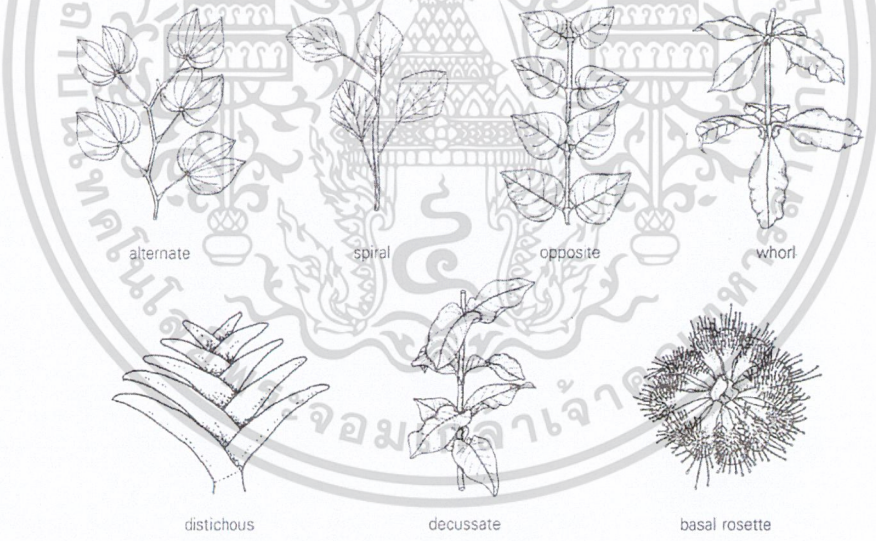
เป็นลักษณะการเรียงตัวของใบบนกิ่งแบบที่แต่ละข้อมีใบหนึ่งใบเท่านั้น ลักษณะโดยทั่วไปของการเรียงตัวของใบแบบสลับนั้น ตำแหน่งของใบในแต่ละข้างของกิ่งเรียงอยู่ในแนวเดียวกัน ทำให้ลักษณะของใบบนกิ่งออกสลับซ้ายขวาคนละทิศทางกัน เรียงเป็นสองแถว ซึ่งมีแบบบันไดเวียนเรียก “Spiral” แบบกระจายไปตามแนวรัศมีจากแกนลำต้น เรียก “Basal rosrtte” การเรียงสลับระนาบเดียวเรียก “Distichous” การเรียงตัวของใบแบบสลับทั่วไปเรียก “Alternate”

2.2.3.2 แบบคู่ตรงข้าม

ลักษณะการเรียงของใบที่หนึ่งข้อมีจำนวนใบสองใบออกเป็นคู่และอยู่ตรงข้ามกัน หรืออยู่คนละด้านของกิ่งหรือลำต้นที่ข้อเดียวกัน เช่น ช้องนาง และถ้าเรียงตั้งฉากกันคล้ายรูปกากบาทเรียกว่าเป็นแบบคู่ตรงข้ามสลับตั้งฉาก (Decussate) เช่น เข็ม ยอ

2.2.3.3 แบบวงรอบข้อ

ลักษณะการเรียงของใบที่หนึ่งข้อมีจำนวนมากกว่าสองใบ และเรียงเป็นวงอยู่รอบข้อเดียวกัน เช่น บานบุรี



รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะการเรียงตัวของใบบนกิ่งหรือลำต้น

ที่มา : ชุมพล คุณวาสี (2551)

2.2.4 ดอก

ดอก คือ กิ่งที่เปลี่ยนแปลงไป มีลักษณะพิเศษเพื่อทำหน้าที่ในการสร้างเมกะสปอร์ซึ่งเกิดภายในออวุลในรังไข่ของเกสรเพศเมีย และไมโครสปอร์ซึ่งเกิดในโพรงอับเรณู ในอับเรณูของเกสรเพศผู้พบเฉพาะในพืชดอกเท่านั้น

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.2.4.1 ประเภทและส่วนประกอบของดอก

ดอกที่เจริญมาจากตาดอกนั้นอาจเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อดอกที่ประกอบด้วยดอกย่อยมากกว่า 1 ดอก ดอกประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ 4 ชั้นติดบนฐานดอก องค์ประกอบของดอกในแต่ละชั้นคือใบที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะและหน้าที่แตกต่างกันไปจากใบปกติ และเรียงเป็นวงจากรอบนอกไปสู่กลางดอกดังนี้ (รูปที่ 2.11)

1) ชั้นวงกลีบเลี้ยง ประกอบด้วยหน่วยย่อยแต่ละส่วนที่เรียกว่ากลีบเลี้ยง

2) ชั้นวงกลีบดอก ประกอบด้วยกลีบดอก

3) ชั้นวงเกสรเพศผู้ ประกอบด้วยเกสรเพศผู้

4) ชั้นวงเกสรเพศเมีย ประกอบด้วยเกสรเพศเมีย

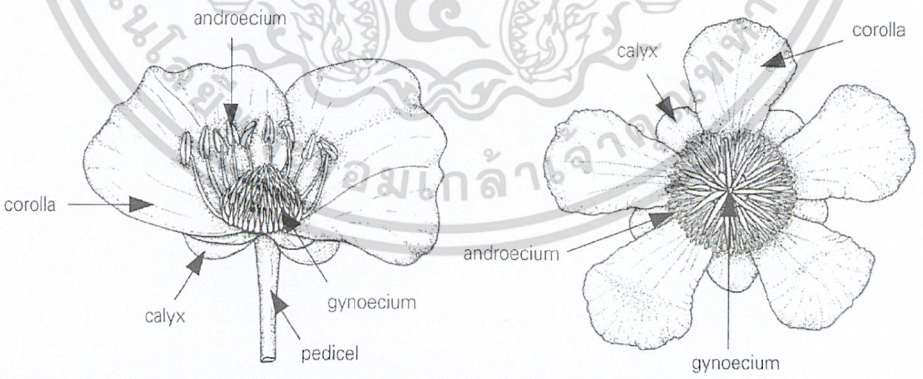
ส่วนประกอบในแต่ละชั้นอาจเชื่อมติดกันเอง หรือเชื่อกันระหว่างส่วนประกอบของแต่ละชั้น ระดับของการเชื่อมติดกันมากน้อยแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ทำให้เกิดความหลากหลายของลักษณะรูปร่างหรือรูปทรงของดอก และสามารถแยกชนิดของดอกได้เป็นดังนี้ (รูปที่ 2.12)

1) ดอกสมบูรณ์ คือดอกที่มีองค์ประกอบทั้ง 4 ชั้นครบถ้วน

2) ดอกไม่สมบูรณ์เพศ คือดอกที่องค์ประกอบไม่ครบทั้ง 4 ชั้น

3) ดอกสมบูรณ์เพศ คือดอกที่มีชั้นวงเกสรเพศผู้ และวงเกสรเพศเมียอยู่ภายในดอกเดียวกัน

4) ดอกไม่สมบูรณ์เพศ คือดอกที่พบชั้นวงของเพศผู้หรือวงเกสรเพศเมียอย่างใดอย่างหนึ่ง

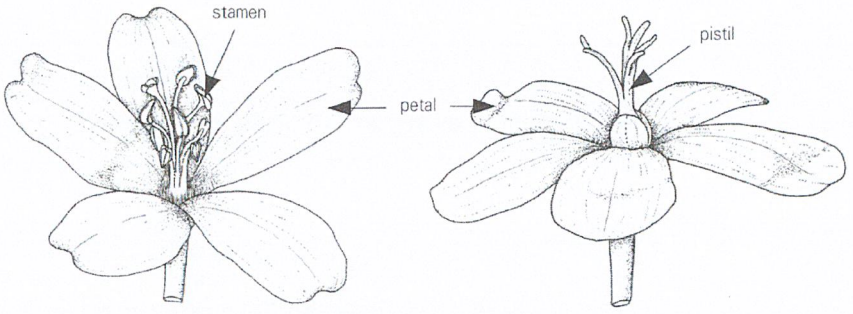


รูปที่ 2.11 แสดงองค์ประกอบของดอกแต่ละชั้นของดอกเอมะซอน (ซ้าย) ที่ดึงกลับดอกออก 1 กลีบและดอกส้าน (ขวา)

ที่มา : ชุมพล คุณวาสี (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

117246



รูปที่ 2.12 แสดงลักษณะของดอกเพศผู้ (ซ้าย) และดอกเพศเมีย (ขวา)
ที่มา : ชุมพล คุณวาสี (2551)

2.3 การประยุกต์ใช้ (ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/Passion_flower 1 ตุลาคม 2553)

2.3.1 ดอก

มีลูกผสมหลายร้อยสายพันธุ์ที่ได้มีการตั้งชื่อและทำการผสมพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณดอก ใบ และผล *Passiflora* หลายสายพันธุ์ได้มีการนำออกปลูกสู่ธรรมชาติเนื่องจากดอกมีความสวยงาม ในสมัยของพระนางเจ้าวิคตอเรียดอกได้รับความนิยมมากและสร้างลูกผสมมากมาย โดยใช้สายพันธุ์ *P. alata* และ *P. caerulea* และสายพันธุ์เขตร้อนอื่น ๆ มี *Passiflora* อยู่หลายสายพันธุ์ที่เจริญได้ในเขตหนาวเย็นจากเทือกเขาแอนดีซ สามารถเจริญให้ดอกและผลที่สวยงาม ในสภาพอากาศที่หนาวเย็นแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน เช่น อ่าวมอนเตอเรย์ เบย์ และซานฟรานซิสโกในรัฐแคลิฟอร์เนีย และตามชายฝั่งทางตะวันตกของสหรัฐอเมริกาจนถึงแคนาดา จะมีสีน้ำเงินหรือพันธุ์ลูกผสมที่มีขนาดใหญ่

2.3.2 ผล

สายพันธุ์ส่วนใหญ่มีผลรูปร่างกลมหรือยาวเรียวสามารถกินได้ มีความยาว 2 ถึง 8 นิ้ว กว้าง 2 นิ้ว โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์หรือการเพาะปลูก เช่น *P. edulis* ให้ผลที่กินได้โดยนำมาทำเป็นน้ำผลไม้ ปลูกอย่างแพร่หลายในแถบทะเลแคริบเบียนและทางตอนใต้ของรัฐ ฟลอริดาและแอฟริกาใต้ ซึ่งผลสีม่วงลูกจะเล็ก เหี่ยวง่ายและผลสีเหลืองจะมีขนาดใหญ่กว่า ผลเป็นมันเงาปลูกเพื่อขายเป็นทางการค้า

สวีต แกรนนาดิลล่า (*P. ligularis*) เป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่มีการเจริญอย่างแพร่หลาย ส่วนใหญ่อยู่ในประเทศแอฟริกาและประเทศออสเตรเลียเรียกผลว่า แพชชั่นฟรุต

ชาวแอฟริกาใต้นิยมเรียกว่า แกรนนาดิลล่ามากกว่า ลักษณะผลของ *P. ligularis* จะอยู่ระหว่าง *P. edulis* ทั้งสองแบบและเป็นที่ต้องการของตลาดเช่นเดียวกับ *P. edulis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมย์ปือป (*P. incarnata*) เป็นสายพันธุ์ที่อยู่ทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศอเมริกา เป็นตัวอย่างของสายพันธุ์ที่อยู่ในเขตร้อน ผลมีรสชาติหวาน รูปร่างกลมเท่ากับไข่ไก่ สามารถรับประทานได้

ไจแอนท์ แกรนนาดิลล่า (*P. quadrangularis*) วอเตอร์ เลมอน (*P. laurifolia*) และสวีต คาลาบัช (*P. maliformis*) *Passiflora* สายพันธุ์พวกนี้เป็นผลไม้ที่รู้จักกันดีเฉพาะถิ่น ไวด์ มาราคูจา (*P. foetida*) ซึ่งเป็นที่นิยมในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ *Passiflora* บานาน่า เป็นผลไม้ที่มีรูปร่างยาว *P. tripartita* และ *P. tarminiana* ปลูกยากมากกว่าพันธุ์อื่นๆ

2.3.3 ใช้เป็นยาและรักษาอาการโรคประสาท

ใบและรากของ *P. incarnata* มีประวัติการใช้มายาวนานในพวกชนพื้นเมืองของอเมริกันในทวีปอเมริกาเหนือและได้มีการปรับปรุงโดยชาวยุโรปที่เข้ามาล่าอาณานิคม นำมาใช้ ใบสดหรือใบแห้งของเมย์ปือปถูกใช้ทำเป็นชาเพื่อรักษาโรคนอนไม่หลับ โรคฮีสทีเรีย และโรคลมบ้าหมู *P. edulis* และสายพันธุ์อื่น ๆ ใช้ทำเป็นยาบรรเทาอาการโรคพวกนี้เหมือนกันในตอนกลางและตอนใต้ของประเทศอเมริกา ใบที่แห้งสามารถนำมาใช้สูบได้

หลายสายพันธุ์พบว่ามีสารอัลคาลอยด์ บีตาคาร์โปลีน ฮาร์มาลา ซึ่งเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่หมู่เอมีนตำแหน่งแรก รวมทั้งมีคุณสมบัติต่อต้านการกดประสาท ดอกและผลใช้หาสารเคมีเท่านั้น แต่ใบและรากจะมีศักยภาพมากกว่าใช้เป็นยาเพื่อเพิ่มความจำ สารอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่คือฮาร์แมน (1-เมทธิล-9เอช-บี-คาร์โบลีน) แต่ที่พบคือฮาร์โมลีน (4,9-ไดไฮโดร-7-เมทธิลออกซี-1-เมทธิล-3เอช- ไพริโด-3,4-บีอินโดล) ฮาร์โมลอล (1-เมทธิล-2,3,4,9- เตตระไฮโดรไพริโด-3,4-บีอินโดล-7-วัน) ฮาร์มีน (7-เมทโทออกซี-1-เมทธิล-9เอช-ไพริโด-3,4-บีอินโดล) และฮาร์โมน สายพันธุ์ที่พบว่ามีสารอัลคาลอยด์ (รูปที่ 2.13) เช่น *P. actinia*, *P. alata*, *P. alba*, *P. bryonoides*, *P. caerulea*, *P. capsularis*, *P. decaisneana*, *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. foetida*, *P. incarnata*, *P. quadrangularis*, *P. subpeltata* และ *P. warmingii* และพบสาร คริปซินและฟลาโวนอยด์ใน *Passiflora* พวกดอกสีน้ำเงิน เช่น *P. caerulea*

สารประกอบอื่นที่พบในดอก *Passiflora* คือ คูมาริน เช่น สโคโปเลทิน และ อัมเบลลิฟีโรน มอลทอล ไฟโตสเตียรอล เช่น ลูทีนิน และ ไซยาโนจีนิก ไกลโคไซด์ เช่น จีโนคาร์ดิน พบในบางสายพันธุ์เช่น *P. adenopada* ซึ่งค่อนข้างจะเป็นพิษ

กรดอินทรีย์ที่พบมากคือ ฟอร์มิก บิวทีริก ลิโนเลอิก ลิโนเลนิก มาลิก ไมริกทิก โอเลอิก และกรดปาล์มมิติก เช่นเดียวกับสารประกอบฟีนอลิกและกรดอะมิโน สารพวกเอสเทอร์ เช่น เอทธิลบิวทาเลท เอทธิลคาร์โพเลท เอ็น-เฮกซิลบิวทีเลทและเอ็น-เฮกซิลคาร์โพเอทแป็นสารให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลิ่นรส พวกน้ำตาล เช่น ดี-ฟรุกโตส ดี-กลูโคส และแรฟฟิโนส เอนไซม์ที่พบ เช่น แคตาเลส เพคติน เมทธิลเอสเทอเรส และฟีโนเรส

มีการศึกษา *Passiflora* 2-3 พันธุ์ที่นำสารสกัดที่ได้มาทำเป็นยารักษาโรค ในการทดลองแรก ๆ พบว่าสารสกัดเมย์ปือปมีฤทธิ์เหมือนออกซาซีแพมแต่มีผลค้างเคียงน้อยกว่าและยังมีการศึกษาต่อไปในเรื่องนี้

2.3.3.1 ผลข้างเคียง

ยังคงต้องศึกษาผลต่อไป และมีการศึกษาหนึ่งในหนูพบว่าสารจาก *P. alata* มีความเป็นพิษต่อยีนของเซลล์หนู

2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (http://thaigoodview. com/node/50742. 1 ตุลาคม 2553)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น อวัยวะ เนื้อเยื่อ และเซลล์มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ โดยมีการควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง และความชื้น ส่วนต่าง ๆ ของพืชเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ โดยอาศัยคุณสมบัติพิเศษของเซลล์พืชที่สามารถเจริญเติบโตพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้

2.4.1 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (วราพร, 2552)

2.4.1.1 การขยายสายพันธุ์พืช (clonal propagation) สามารถเพิ่มปริมาณพันธุ์พืชจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วโดยอาศัยสูตรอาหารที่เหมาะสม อีกทั้งยังประหยัดเวลา เนื้อที่และแรงงาน โดยไม่ต้องประสบกับปัญหาจากสภาพแวดล้อมธรรมชาติ

2.4.1.2 การปรับปรุงพันธุ์พืช (crop improvement) สามารถสร้างพืชพันธุ์ต่าง ๆ ได้ตามความต้องการ การผลิตพืชปลอดโรค การถ่ายละอองเกสรหรือการผสมเพื่อแก้ปัญหาความล้มเหลวในการผสมเกสรของพืชบางชนิดในสภาพธรรมชาติ การรวมโพรโทพลาสต์ การเคลื่อนย้ายยีนเพื่อสร้างพืชจำลองพันธุ์ เป็นต้น

2.4.1.3 การเก็บรักษาพันธุกรรมพืช (germplasm preservation) สำหรับพืชที่มีคุณค่าบางชนิด เช่น พืชหายากและมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์ เป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีคุณค่าและใกล้จะสูญพันธุ์ สามารถเก็บรวบรวมไว้ในสภาพปลอดเชื้อและควบคุมสภาวะให้มีการเจริญเติบโตช้ามาก ๆ เพื่อคงความมีชีวิตเป็นเวลานาน หรือทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ 196 องศาเซลเซียส และสามารถนำกลับมาเพิ่มปริมาณและย้ายปลูกได้เมื่อต้องการขยายพันธุ์ต่อไป

2.4.1.4 การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เป็นประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชสามารถกระตุ้นให้มีการผลิตสารทุติยภูมิต่าง ๆ เช่น รงควัตถุ อัลคาลอยด์ และน้ำมันหอมระเหย เป็นต้น ที่มีประสิทธิภาพและปริมาณสูงกว่าการผลิตจากพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในธรรมชาติ อีกทั้งในระยะยาวจะช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายรวมทั้งสามารถควบคุมปริมาณและคุณภาพของผลผลิตได้ตามต้องการ

2.4.2 องค์ประกอบของอาหาร (อนุรักษ์, 2550)

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ พืชต่างชนิดกันมีความต้องการธาตุอาหารต่างกันดังนั้นจึงมีการค้นคิดสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชนิดของพืช

2.4.2.1 สารอนินทรีย์ (Inorganic nutrients) ได้แก่ แร่ธาตุอาหารต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แร่ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณมาก และขาดไม่ได้ แร่ธาตุอาหารรอง แร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณน้อย แต่ขาดไม่ได้ เช่น เหล็ก แมงกานีส โคบอลต์ สังกะสี โมลิบดีนัม ทองแดง โบรอน

2.4.2.2 สารอินทรีย์ (Organicnutrients) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม

1) คาร์โบไฮเดรตใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีส่วนสำคัญในการให้พลังงานแก่เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ น้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีทั้งชนิดที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น กลูโคส ซูโครส มอลโทส

2) วิตามิน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สำคัญ มีผลทำให้พืชมีการพัฒนาและเจริญเติบโตมีหลายชนิด เช่น ไทอามีน อินโนสิทอล ไนอะซิน

3) กรดอะมิโน มีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก กรดอะมิโนมีประมาณ 20 ชนิด และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกันไป เช่น ไกลซีน อะลานีน อาร์จีนีน แอสปาราจีน กรดแอสปาติก ซีสทีน

4) สารเร่งการเจริญ การเติมสารที่ช่วยเร่งการเจริญของพืชลงไปในอาหารมีความสำคัญ ซึ่งจะช่วยให้เนื้อเยื่อเหล่านั้นเจริญได้ดีขึ้น เช่น ออกซิน (auxin) ไซโตไคนิน (cytokinin) และจิบเบอเรลลิน (gibberellins) อย่างไรก็ตามความต้องการของเนื้อเยื่อต่อสารเหล่านี้ก็แตกต่างกันไป และเชื่อว่ายังขึ้นกับระดับของฮอร์โมนที่มีอยู่ภายในด้วย เช่น

ออกซิน (auxin) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำเอาออกซินไปใช้ในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเกิดราก โดยทั่วไปการละลายออกซินใช้เอทานอลหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางเป็นตัวทำละลายออกซินที่นิยมใช้กัน คือ กรด 2,4 ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4-D) กรดอินโดลอะซิติก (IAA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซโตไคนิน (cytokinin) เติมลงไปเพื่อช่วยให้กระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นหน่อเล็ก จากส่วนของแคลลัสหรืออวัยวะที่เพาะเลี้ยง การละลายใช้กรดเกลือเจือจางหรือเบสเจือจางไซโตไคนินที่นิยมใช้คือ ซีเอติน 2-ไอโซเพนทินิลอะมิโนเพียวรีน (2iP)

จิบเบอเรลลิน (gibberellins) ใช้กระตุ้นการแบ่งเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์ชักนำให้เมล็ดเกิดการงอก จะละลายในเมทานอล เอทานอล และอะซิโตนจิบเบอเรลลินที่นิยมใช้ คือ กรดจิบเบอร์เรลลิก (GA_3)

5) สารอื่น ๆ ส่วนใหญ่จะได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำมะเขือเทศ กล้วยบด หรือน้ำสกัดผัก เป็นต้น

6) วุ้น เป็นสารเพิ่มความแข็งในอาหารที่นิยมกันมากที่สุด เพราะราคาถูกส่วนใหญ่เป็นสารพวก polysaccharide ปริมาณวุ้นที่ใช้จะขึ้นอยู่กับความต้องการที่จะให้อาหารแข็งมากหรือน้อย ส่วนใหญ่จะใช้ประมาณ 0.3-1 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับคุณภาพของวุ้น และนอกจากนี้ยังมีวุ้นคุณภาพสูง ได้แก่ เจลแลนกัม ซึ่งมีลักษณะใสมาก สามารถมองเห็นการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ชัดเจน และอะกาโรสเหมาะสำหรับเซลล์พืชโปรโตพลาสต์

2.4.2.3 น้ำ เป็นองค์ประกอบหลักของอาหาร น้ำที่ใช้ควรเป็นน้ำกลั่น หรือน้ำที่ปราศจากอิออน

2.4.2.4 พีเอช มีผลต่อการดูดใช้ธาตุอาหารของเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืช ส่วนใหญ่นิยมใช้อยู่ในช่วง 5.0-6.0 กรณีถ้าใช้พีเอชต่ำกว่า 5.0 ซึ่งเป็นกรดอาจทำให้อาหารไม่แข็งได้ทำให้ไม่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.5 หลักการสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปจะไม่ได้อยู่เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่อิสระ แต่จะรวมตัวอยู่กับโปรตีนฮีสโตนและโปรตีนที่ไม่ใช่ฮีสโตน เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนของโครมาตินนอกจากนี้ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตยังประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และอาร์เอ็นเอ (nascent RNA) ดังนั้นในการสกัดดีเอ็นเอออกจากสิ่งมีชีวิตต้องอาศัยหลักการดังนี้

1) ทำลายผนังเซลล์ (cell wall lysis) โดยใช้สาร lysozyme (นิยมใช้ในโปรคาริโอต) หรือใช้สารดีเทอร์เจนต์ (นิยมใช้ในยูคาริโอต) อาทิ sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium lauroyl sarcosinate

2) การย่อยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ โดยใช้เอนซ์โปรติเอสและอาร์เนส ตามลำดับ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยฟีนอลหรือคลอโรฟอร์ม (บางครั้งอาจเติมเกลือเช่น sodium chloride หรือ sodium acetate เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้ cool absolute ethanol (อาจเติมเกลือ sodium acetate ด้วย) โดยเกิด dehydrate water ออกจากสายดีเอ็นเอ จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำหรือ TE buffer เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.6 เทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR)

(ที่มา http://bkw.ac.th/content/snet4/genetics/pcr.htm 23 กันยายน 2553)

เทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction) หรือพีซีอาร์ เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการดีเอ็นเอเรพลิเคชัน (DNA Replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอนไซม์พวกดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า In vitro enzymatic gene amplification เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิคพีซีอาร์คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิคพีซีอาร์ ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้าน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจากเอ็มอาร์เอ็นเอ การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

2.6.1 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

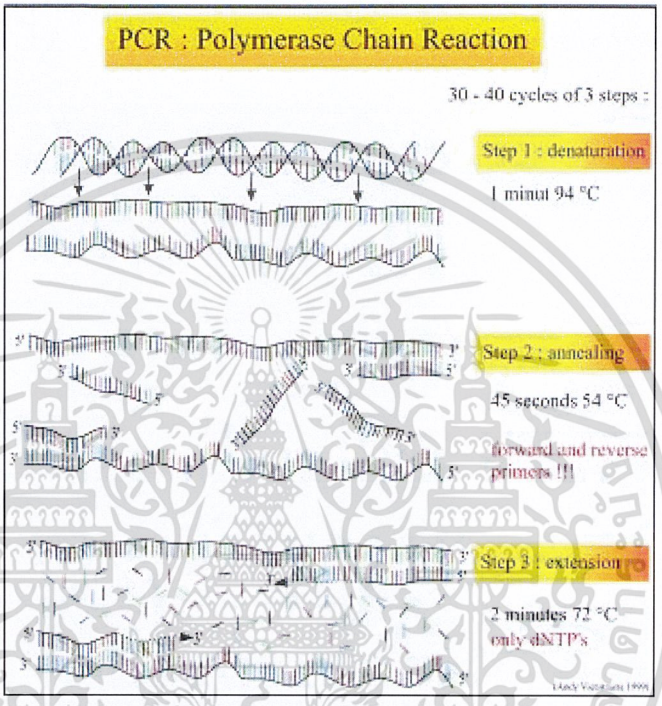
ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ thermostable DNA poloymerase deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP dGTP dCTP dTTP Oligonucleotide และไพรเมอร์อย่างน้อย 1 คู่ บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสมี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอนจนครบจำนวนรอบ

ขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ แยกสายดีเอ็นเอที่เป็นสายต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง และทำให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 13-14 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบจับคู่กันได้ ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่สาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากทิศทางส่วนปลาย 5' ไป 3' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งเอ็นไซม์นี้จะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน ปกติจะใช้อุณหภูมิในช่วง 72-75 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 แสดงหลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์
ที่มา : http://www.barascientific.com/article/DNA/images/DNA-06.jpg
(29 กันยายน 2553)

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ปฏิกิริยา 25-40 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่าล้านๆ เท่า (2^n เมื่อ n คือ จำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา)

2.6.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาพีซีอาร์

เนื่องจากการทำพีซีอาร์เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์มีดังต่อไปนี้

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2.1 Deoxynucleotides triphosphates (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ตัว (dATP dCTP dGTP dTTP) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2.6.2.2 Thermostable DNA polymerase เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ *Taq* DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ Thermus aquaticuse (*Taq*) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์สร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่

2.6.2.3 นิวคลีโอไทด์ตั้งต้นหรือไพรเมอร์ เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำพีซีอาร์จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

2.6.2.4 บัฟเฟอร์ (buffer) เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม ประกอบด้วย Tris-HCL KCl $MgCl_2$ และ Glycerol ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือพีเอช 7-7.5

2.6.2.5 ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่มีลำดับเบสเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสม

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่องพีซีอาร์) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

2.7 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis of DNA)

(สุรินทร์,2545)

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel)

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่ประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอ (หรือ อาร์เอ็นเอ) จึงมีประจุเป็นลบที่พีเอชเป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอนเอด้วย

2.7.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.7.1.1 ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง เกลียวคู่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล ถ้านำระยะทางที่โมเลกุลเคลื่อนที่ (mobility) มาเขียนกราฟคู่กับค่าล็อก (log) ของโมเลกุล (molecular weight) จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ ซึ่งมีความสัมพันธ์ลักษณะเส้นตรงอยู่ช่วงหนึ่งดั้งนั้นถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแล้ว นำมาเขียนกราฟระหว่างระยะทางที่เคลื่อนที่และล็อกของน้ำหนักโมเลกุลเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน ทั้งนี้จะต้องเปรียบเทียบในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสครั้งเดียวกันเท่านั้น เนื่องจากเป็นค่าแบบสัมพัทธ์

2.7.1.2 รูปแบบของดีเอ็นเอ (configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้น ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดซึ่งจะพบรูปแบบทั้ง 3 ของดีเอ็นเอได้ในการสกัดพลาสมิด

2.7.1.3 เปอร์เซ็นต์ของชนิดเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิกหรือโพลีอะคริลาไมด์เจลและอะกาโรสเจล

2.7.1.4 แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดีแต่ถ้าต่ำดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้าการแยกตัวได้ดีแต่แถบดีเอ็นเอจะไม่ชัด เพราะเกิดการแพร่

2.7.1.5 บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TEA (Tris-acetate), TBE (Tris- borate) และ TPE (Tris-phosphate) นิยมใช้ที่มีความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้คือ TPE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็วการเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Valeria และคณะ (2003) ศึกษาความหลากหลายเกี่ยวกับวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของพืชในสกุล *Passiflora* จำนวนทั้งหมด 61 สายพันธุ์ ในตำแหน่ง internal transcribed spacers (ITS) บน ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ตำแหน่ง trnL-trnF และบริเวณตำแหน่ง rps4 ในคลอโรพลาสดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสกุลย่อย *Distephana*, *Dysosmia*, *Dysosmioides*, *Passiflora* และ *Tacsonioides* ซึ่งเรียกกลุ่มนี้ว่า *Passiflora* clades กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสกุลย่อย *Adopogyne*, *Decaloba*, *Murucuja* และ *Pseudomurucuja* เรียกกลุ่มนี้ว่า *Decaloba* clades และกลุ่มที่ 3 สกุลย่อย *Astrophea* เรียกกลุ่มนี้ว่า *Astrophea* clades

Yockteng และ Nadot (2004) ศึกษาความหลากหลายเกี่ยวกับวิวัฒนาการของพืชสกุล *Passiflora* โดยใช้บริเวณตำแหน่ง สังเคราะห์กลูตามีน (ncpGS) และบริเวณตำแหน่งยีน maturase K (matK) ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสดีเอ็นเอ จากการศึกษาลักษณะทั้งหมด 90 สายพันธุ์ พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 8 สกุลย่อยหลัก คือ *Plectostemma Granadilla Astrophea Deidamioides Polyanthea Dysosmia Tetrapathea* และ *Tryphostemmatoides* และผลการศึกษาความหลากหลายเกี่ยวกับวิวัฒนาการนั้นยังทำการศึกษาร่วมกันระหว่างตำแหน่งวิวัฒนาการของสายพันธุ์ที่แตกต่างกันและจำนวนโครโมโซมของพืชสกุล *Passiflora* ซึ่งผลที่ได้แบ่งกลุ่มดังต่อไปนี้ กลุ่มที่ 1 สกุลย่อย *Astrophea* จำนวนโครโมโซม n = 12 กลุ่มที่ 2 สกุลย่อย *Plectostemma* จำนวนโครโมโซม n = 6 กลุ่มสุดท้าย สกุลย่อย *Granadilla* จำนวนโครโมโซม n = 9 ส่วนสกุลย่อย *Dysosmia* มีจำนวนโครโมโซม n = 9-11 จึงพิจารณาให้อยู่ใกล้ชิดกับกลุ่มของสกุลย่อย *Granadilla*

Mäder และคณะ (2009) ได้มีการค้นพบการใช้และข้อจำกัดของบริเวณ ITS ในการวิเคราะห์แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใน *Passiflora* (Passifloraceae) ในงานวิจัยนี้ใช้นิวเคลียสไรโบโซมอลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS เข้าไปหาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน 23 สายพันธุ์ของพืชสกุล *Passiflora* พบความหลากหลายทั้งหมด 21 สายพันธุ์ใน *Passiflora* และ *Decaloba* (DC) ในการวิเคราะห์แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบ่งได้เป็น 6 สปีชีส์ ผลระบุชี้ชัดว่า ITS อาจจะใช้เป็นตัวหาวิวัฒนาการของความหลากหลายพันธุกรรมใน *Passiflora*

Otahola (2000) ได้นำใบ *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* ซึ่งจัดเป็น *Passiflora* ที่มีผลสีเหลืองและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของอเมริกา ออสเตรเลียและแอฟริกามาเพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ โดยมีอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง และจะมีการสร้างแคลลัสที่วันที่ 15 25 และ 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังการเพาะเลี้ยง มีการสร้างตาร่วมด้วยในวันที่ 25 และ 35 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ ซึ่งจะมีการสร้างตามากที่สุดในอาหารที่เติมฮอร์โมน BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

Antognoni และคณะ (2007) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใบในสภาวะที่มีแสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารที่เติมไคเนติน 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถสร้างแคลลัสได้ดีที่สุดจากบริเวณเส้นกลางใบคิดเป็น 80-90 เปอร์เซ็นต์ และสร้างแคลลัสจากบริเวณแผ่นใบ 32-45 เปอร์เซ็นต์ โดยลักษณะของแคลลัสที่ได้เป็นแบบ friable callus

Khiet และคณะ (2006) กล่าวว่า *Passiflora* เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ แต่มักจะมีปัญหาเรื่องเชื้อโรคและสัตว์เลี้ยง มีงานวิจัยบางอันที่ได้รายงานถึงการเกิดยอดและการสร้างต้นใหม่จากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชเหล่านี้โดยใช้เทคนิคที่แตกต่างกัน แต่เป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสม การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นวิธีการศึกษาการเจริญของเซลล์ การสร้างสารทุติยภูมิและการขยายพันธุ์อย่างสำหรับพืชที่มีค่าทางเศรษฐกิจบางสายพันธุ์ การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ทำให้เราเข้าใจการเจริญของเซลล์และหาวิธีการขยายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ จากการศึกษาโดยใช้แคลลัสที่ได้จากต้น *Passiflora* ที่มีผลสีเหลืองที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยก่อน หลังจากนั้น 20 วัน จึงนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและสามารถชักนำให้เกิดยอดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

3.1.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige and Skoog (1962)

3.1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.1.3 น้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ

3.1.4 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

3.1.5 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF1 ของบริษัท vivantis (Extraction DNA Plant)

3.1.6 อะกาโรส (agarose)

3.1.7 สารละลาย TBE บัฟเฟอร์ (Tris Borate EDTA buffer)

3.1.8 RNase A

3.1.9 เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol)

3.1.10 เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์

3.1.11 น้ำปราศจากไอออน (deionization water)

3.1.12 สีย้อมดีเอ็นเอ (dye)

3.1.13 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

3.1.14 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลคู่เบส

3.1.15 ไพรเมอร์ ITS 1 *Passiflora* forward (5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3')

3.1.16 ไพรเมอร์ ITS 2 *Passiflora* reverse (5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3')

3.1.17 *Taq* polymerase บริษัท Biolabs

3.1.18 buffer *taq* บริษัท Biolabs

3.1.19 mix deoxynucleotide triphosphate

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องชั่งแบบละเอียด (balance)

3.2.2 เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven)

3.2.3 กระดาษชั่งสาร (paper wax)

3.2.4 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น การอ้างอิงหรือสำเนาส่วนใดส่วนหนึ่งของเอกสารนี้ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

3.2.6 เครื่องเขย่า (shaker)

3.2.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.8 กรรไกร (scissors)

3.2.9 ปากคีบ (forceps)

3.2.10 ช้อนตักสาร (spatula)

3.2.11 มีดผ่าตัด (knives และ scalpel)

3.2.12 โกร่งและที่บด (mortat และ pestle)

3.2.13 หลอดเซนตริฟิวส์ (microcentrifuge tube)

3.2.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.2.15 ทิปขนาดต่างๆ (tip)

3.2.16 ที่ดูดปล่อยสาร (auto pipette)

3.2.17 เครื่อง spectrophotometer

3.2.18 เครื่อง electrophoresis

3.2.19 เครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ (UV transmission)

3.2.20 เครื่องช่วยผสมสาร (vortex)

3.2.21 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermocycler)

3.2.22 เครื่องแก้ว เช่น จานแก้ว ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แท่งแก้วควนสาร กระบอกตวง บีกเกอร์และขวดวัดปริมาตรขนาดต่างๆ

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.3.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างพืชสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ต่าง ๆ จากพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี โดยตัวอย่างที่เก็บจะเป็นพืชสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ที่รวบรวมมาจากต่างประเทศ และแบ่งสายพันธุ์เป็นรหัสตัวย่อ SAO ดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 รหัสและรายชื่อของตัวอย่างพืชสกุล *Passiflora* ที่ใช้ศึกษาจำนวน 40 สายพันธุ์

SAO 01 *P. yucatanensis*	SAO 21 *P. biflora*
SAO 02 *P. perfoliata*	SAO 22 *P. sprucei*
SAO 03 *P. misera*	SAO 23 *P. amethystina* II
SAO 04 *P. cupraea*	SAO 24 *P. coccinea*
SAO 05 *P. auriculata*	SAO 25 *P. coriacea*
SAO 06 *P. subrotunda*	SAO 26 *P. pallida*
SAO 07 *P. mucronata*	SAO 27 *P. amethystina* 'Cardoso Moreira'
SAO 08 *P. holosericea*	SAO 28 *P. truncata*
SAO 09 *P. micropetala*	SAO 29 *P. foetida* 'Albifora'
SAO 10 *P. rubra*	SAO 30 *P. edulis* var. *flavicarpa*
SAO 11 *P. lutea*	SAO 31 *P. laurifolia*
SAO 12 *P. quinquangularis*	SAO 32 *P. capsularis*
SAO 13 *P. urnaefolia*	SAO 33 *P. trifasciata*
SAO 14 *P. talamancensis*	SAO 34 *P. suberosa*II
SAO 15 *P. sexocellata*	SAO 35 *P. tricuspis*
SAO 16 *P. obtusifolia*	SAO 36 *P. suberosa*I
SAO 17 *P. gardneri*	SAO 37 *P. dispar*
SAO 18 *P. foetida*	SAO 38 *P. caerulea* 'Emil Kugler'
SAO 19 *P. fledermouse*	SAO 39 *P. edmundoi*
SAO 20 *P. racemosa*	SAO 40 *P. arida*

จากนั้นสังเกตลักษณะรูปร่างใบ ปลายใบ โคนใบ ขอบใบ เส้นใบ ต่อมบนใบ (domatea) ลักษณะมือจับ (tendril) ต่อมบนก้านใบ (grand) และการจัดเรียงตัวของใบบนลำต้น ลักษณะหูใบและชนิดของใบแล้วจัดจำแนกกลุ่มตามลักษณะความสัมพันธ์ที่สังเกตได้จากลักษณะสัณฐานวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.2 การศึกษาในระดับโมเลกุล

3.3.1.2.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมตัวอย่างใบพืชสกุล *Passiflora* ที่ไม่เป็นโรคมาทำความสะอาดโดยล้างน้ำสะอาดเอาพวกคราบฝุ่นและสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออก แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำมีดมาเผาไฟเพื่อทำการฆ่าเชื้อและทำการตัดตัวอย่างใบพืชโดยตัดเอาส่วนเส้นกลางและก้านใบออกทิ้งไป นำส่วนใบที่ตัดได้มาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอปริมาณประมาณ 50 – 100 มิลลิกรัม จากตัวอย่างธรรมชาติ

3.3.1.2.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอพืชสำเร็จรูป GF1 (vivantis)

ทำการบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนให้เป็นผงละเอียดแล้วตักใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1 ใน 3 ของหลอด จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PL ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที เติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000-16,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนใสที่ได้ไปใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์อันใหม่ แล้วเติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตรสองเท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว ย้ายสารละลายดีเอ็นเอลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งและปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกรอบ ล้างตะกอนที่ติดอยู่บนเมมเบรนของคอลัมน์ด้วย wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งและปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกรอบหนึ่ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดเซนตริฟิวส์อันใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อละลายดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

3.3.1.2.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยทำการเจือจางดีเอ็นเอ 100 เท่า คือดูดดีเอ็นเอตัวอย่างมา 5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 495 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันภายในหลอดเซนตริฟิวส์อีกอัน ดูดสารละลายตัวอย่างออกมาใส่คิวเวตต์ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น biomate 3 V2.100 โดยมีน้ำกลั่นเป็นค่ามาตรฐาน เครื่องจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรากฏค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณค่าความบริสุทธิ์ที่สกัดได้ รวมทั้งค่าปริมาณดีเอ็นเอ นำค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มาใช้ในการคำนวณปริมาณดีเอ็นต้นแบบที่ใช้ในการทำเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบว่าเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงคำนวณได้ถูกต้อง หลังจากนั้นทำการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TBE buffer เทลงบนเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ให้ท่วมอะกาโรสเจล ดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออน 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยออโตปิเปต และหยอดลงหลุมบนอะกาโรสเจล เปรียบเทียบกับดีเอ็นมาตรฐาน แล้วจึงทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลา 30 นาที หรือจนกระทั่งเห็นสีย้อมดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของความยาวเจล แล้วจึงนำเจลไปย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที ล้างเอทธิเดียมโบรไมด์โดยแช่เจลในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปทำการตรวจสอบผลการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอโดยแสงยูวีและบันทึกผลเป็นภาพถ่าย

3.3.1.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอต้นแบบของพืชสกุล *Passiflora* ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ บริเวณตำแหน่ง internal transcribed spacers (ITS) บนบริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ITS 1 *Passiflora* forward และไพรเมอร์ ITS 2 *Passiflora* reverse (Desfeux และ Lejeune,1996) โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในเทคนิคพีซีอาร์ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3.2 และดูดสารละลายดีเอ็นเอต้นแบบลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้สภาวะดังแสดงในตารางที่ 3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบในเทคนิคพีซีอาร์

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอต้นแบบ	X
น้ำปราศจากไอออน	25 – (8.7 + X)
Forward primer (20 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Reverse primer (20 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Master Mix	6.7
-Buffer *Taq* (1X)	2.5
-dNTPs (1.25 มิลลิโมลาร์)	4
-*Taq* polymerase (1U)	0.2

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	5	1
Denaturation	94	1	35
Annealing	55	0.45	
Extension	72	1.5	
Final extension	72	7	1

3.3.1.2.5 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ทำการตรวจสอบผลผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสว่ามีแถบดีเอ็นขึ้นหรือไม่ และนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ขึ้นแถบดีเอ็นเอส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการจัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอท์ด้วยโปรแกรม ClustaX และแก้ไขข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit ข้อมูลลำดับเบสที่ทำการแก้ไขข้อมูลแล้วจะนำมาทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุกรรมโดยใช้ชุดโปรแกรม PHYLIP ซึ่งจะใช้โปรแกรม seqboot.exe ทำหน้าที่ในการสร้างชุดซ้ำของข้อมูล (boostripping) 1000 ครั้ง นำชุดซ้ำของข้อมูลที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นมาวิเคราะห์ genetic distance โดยใช้โปรแกรม dnadist.exe ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ genetic distance ทำการวิเคราะห์การเชื่อมโยงความคล้ายความต่างของลำดับเบสที่ได้โดยโปรแกรม neighbor.exe และสร้าง แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) จากข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม consense.exe ซึ่งจะสามารถเปิดดูข้อมูลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้ด้วยโปรแกรม Treeview

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.3.2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเนื้อเยื่อลำต้นและใบให้เจริญเป็นแคลลัส

นำลำต้นและใบของ *Passiflora* พันธุ์ลูกผสมที่มีความสมบูรณ์มาล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกภายนอกออก แล้วแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่เติม tween-20 ในอัตราส่วน 1 หยดต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายออก เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วทำการล้าง 2-3 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที ใช้ปากคีบย้ายลำต้นและใบวางลงบนจานแก้วที่มีกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รอให้แห้งพอสมควร ตัดลำต้นให้เป็นท่อน ๆ โดยแต่ละท่อนยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ส่วนใบตัดเป็นชิ้น ขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร ย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เปรียบเทียบกับสภาวะที่มืด ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) กำหนดให้แต่ละหน่วยทดลองมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้น บันทึกจำนวนลำต้นและใบที่เจริญเป็นแคลลัสแล้วคำนวณเป็นร้อยละการเกิดแคลลัสตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละการเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนลำต้นหรือใบที่เจริญเป็นแคลลัส}}{\text{จำนวนลำต้นหรือใบทั้งหมด}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

เลือกใช้แคลลัสจากอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D แล้วให้ลักษณะแคลลัสที่แข็งแรง ประกอบด้วยเซลล์เกาะติดกันและสามารถแบ่งออกเป็นชิ้นได้ง่ายด้วยช้อนตักสารสแตนเลส แบ่งแคลลัสออกมา 0.5 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดเดิมในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อวัดปริมาณแคลลัสในระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 วัน ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ในแต่ละช่วงระยะเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงถึงระยะเวลาที่กำหนดทำการกรองเซลล์แขวนลอย เพื่อหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยนำกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 90 มิลลิเมตร ใส่ในจานแก้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักของกระดาษกรองและบันทึกค่าไว้ นำแผ่นกระดาษกรองวางลงบนกรวยกรอง (Bucher funnel) แล้วนำไปต่อเข้ากับขวดรูปชมพู่ เพื่อทำการกรองในระบบสุญญากาศ เทน้ำกลั่นผ่านกระดาษกรอง รอจนน้ำไม่หยดแล้วจึงนำกระดาษกรองไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อใช้หาน้ำหนักสด ใช้กระดาษกรองอันเดิมกรองแคลลัสภายใต้ระบบสุญญากาศ แล้วนำกระดาษกรองที่มีแคลลัสอยู่ไปชั่งน้ำหนักสด จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีแคลลัสไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักแห้ง หาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของทั้ง 2 ขวด และนำมาเขียนกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุล *Passiflora* โดยนำมาพิจารณาชนิดของใบ รูปร่างใบ ปลายใบ โคนใบ ขอบใบ เส้นใบ ต่อมบนใบ ต่อมบนก้านใบ ลักษณะมือจับลักษณะหูใบและการจัดเรียงตัวของใบบนลำต้นแล้วนำมาจัดจำแนกกลุ่มตามลักษณะความสัมพันธ์ที่สังเกตได้ จากการศึกษาทั้งหมด 40 สายพันธุ์ พบว่าพืชสกุลนี้แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะเฉพาะแตกต่างกัน โดยสกุล *Passiflora* มีชนิดของใบแบบใบเดี่ยว (simple) คือใบมีแผ่นใบหนึ่งแผ่นบนก้านใบและไม่มีรอยต่อระหว่างโคนของแผ่นใบกับก้านใบ ลักษณะหูใบเป็นแบบหูใบอิสระข้างก้านใบ (free lateral) ยกเว้นสายพันธุ์ *P. subrotunda*, *P. mucronata*, *P. gardneri*, *P. racemosa*, *P. sprucei*, *P. amethystina*II, *P. amethystina* 'Cardoso Moreira', *P. foetida* 'Albiflora', *P. dispar*, *P. caerulea* 'Emil Kugler', *P. arida* และ *P. edmundoi* มีลักษณะหูใบแบบหูใบแผ่ออกคล้ายใบ (foliaceous) ส่วน *P. foetida* มีลักษณะหูใบแบบหูใบระหว่างก้านใบ (interpetiolar) สำหรับการจัดเรียงตัวของใบบนลำต้นเป็นแบบสลับ (alternate) ยกเว้น *P. mucronata* และ *P. lutea* มีการจัดเรียงตัวของใบบนลำต้นเป็นแบบเรียงเวียน (spiral) เส้นใบที่พบมี 3 แบบ คือ การเรียงเส้นใบย่อยร่างแหแบบนิ้วมือ (reticulate palmate) การเรียงเส้นใบย่อยร่างแหแบบขนนก (reticulate pinnate) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในสายพันธุ์ส่วนใหญ่ ยกเว้น *P. caerulea* 'Emil Kugler' มีการเรียงเส้นใบย่อยร่างแหแบบนิ้วมือชนิดแยกออกจากกัน (reticulate palmate-divergent) ลักษณะมือจับพบว่าทุกสายพันธุ์มีมือจับ แต่ลักษณะมือจับแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับสีและลักษณะการม้วนตัวของมือจับ ต่อมบนใบมีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มี ได้แก่ *P. yacatanensis*, *P. perfoliata*, *P. misera*, *P. auriculata*, *P. micropetara*, *P. urnaefolia*, *P. talamancensis*, *P. sexocellata*, *P. fledermouse*, *P. biflora*, *P. coriacea*, *P. truncata*, *P. trifasciata* และ *P. tricuspis* ซึ่งต่อมจะอยู่บนแผ่นใบ แต่จะมีบางสายพันธุ์คือ *P. amethystin*a 'Cardoso Moreira', *P. edulis* var *flavicapa*, *P. P. caerulea* 'Emil Kugler' และ *P. arida* มีต่อมอยู่บริเวณขอบใบ โดยลักษณะการเรียงตัวของต่อม จำนวนต่อม ขนาดและสีจะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ส่วนใหญ่มีต่อมบนก้านใบที่มีลักษณะเฉพาะ แต่มีเพียงบางสายพันธุ์ที่ไม่มีต่อมบนก้านใบ ได้แก่ *P. yacatanensis*, *P. perfoliata*, *P. misera*, *P. cupraea*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P. mieropetala, *P. rubra*, *P. lutea*, *P. quinquangularis*, *P. urnaefolia*, *P. talamancensis*, *P. fledermouse*, *P. biflora*, *P. capsularis*, *P. trifasciata*, *P. tricuspis* และ *P. edmundoi*

สำหรับรูปร่างใบ ปลายใบ โคนใบและขอบใบนั้นสามารถจัดจำแนกออกเป็นกลุ่มได้หลายแบบดังนี้ รูปร่างใบจำนวน 12 กลุ่มคือ สามแฉกหยักตื้น สามแฉกหยักลึก สองแฉก เรียวยาวด้านข้าง รูปสามเหลี่ยมกลับ (Obdeltoid) รูปไข่ (Ovate) รูปแฉกแบบนิ้วมือ (Palmatifid) รูปหัวใจ (Cordate) รูปกลม (Orbicular) รูปสามเหลี่ยมข้าวหลามตัด (Rhomboid) และรูปเงี่ยงใบหอก (Hastate) (ตารางที่ 4.1)ดังตัวอย่างลักษณะใบในกลุ่มที่ 3 เช่น *P. micropetala, P. fledermouse*, *P. capsularis* (รูปที่ 4.1) กลุ่มที่ 4 เช่น *P. sexocellata*, *P. coriacea* (รูปที่ 4.2) กลุ่มที่ 6 เช่น *P. laurifolia, P. dispar* (รูปที่ 4.3) และกลุ่มที่ 11 เช่น *P. amthystina* 'Cardoso Moreira' (รูปที่ 4.4) ปลายใบ 8 กลุ่มคือ ปลายตัด (Truncate) ปลายเว้า (Emarginate) ปลายเป็นติ่งแหลม (Cuspidate) ปลายแหลม (Acute) ปลายเว้าตื้น (Retuse) ปลายมน (Obtuse) ปลายเป็นติ่งหนาม (Mucronate) และปลายเรียวแหลม (Acuminate) (ตารางที่ 4.2) ขอบใบ 8 กลุ่มคือ ขอบจักฟันเลื่อยซ้อน (Double serrate) ขอบหยักเป็นคลื่น (Undulate) ขอบเป็นขนครุย (Ciliate) ขอบหยักเว้าพู (Lobed) ขอบหยักลึกแฉกแบบนิ้วมือ (Divided palmatifid) ขอบเป็นแฉก (Parted) ขอบเรียบ (Entire) และขอบจักฟันเลื่อย (Serrate) (ตารางที่ 4.3) โคนใบ 9 กลุ่มคือ โคนใบรูปหุ้มลำต้น(Amplexicaul) โคนใบรูปลิ่ม (Connate) โคนใบแบบรอบข้อ (Perfoliate) โคนใบเบี้ยว (Oblique) โคนใบรูปเงี่ยงใบหอก (Hastate) โคนใบตัด (Truncate) โคนใบรูปแหลม (Acute) โคนใบรูปติ่งหู (Auriculate) โคนใบมน (Obtuse) และ โคนใบรูปหัวใจ (Cordate) (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การจัดจำแนกตามลักษณะของรูปร่างใบ

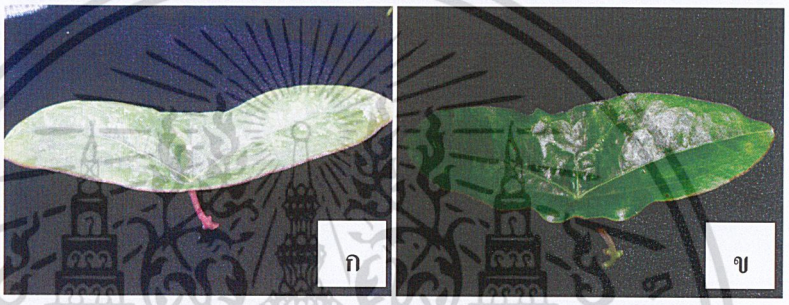
กลุ่มที่	รูปร่างใบ	สายพันธุ์
1	สามแฉกหยักตื้น	*P. lutea*, *P. truncata*
2	สามแฉกหยักลึก	*P. sprucei*, *P. trifasciata*, *P. tricuspis*, *P. edmundoi*
3	สองแฉก	*P. yucatanensis*, *P. micropetala*, *P. rubra*, *P. quinquangularis*, *P. urnaefolia*, *P. fledermouse*, *P. biflora*, *P. capsularis*
4	เรียวยาวด้านข้าง	*P. perfoliata*, *P. misera*, *P. sexocellata*, *P. coriacea*
5	รูปสามเหลี่ยมกลับ	*P. talamancensis*
6	รูปไข่	*P. cupraea*, *P. mucronata*, *P. coccinea*, *P. laurifolia*, *P. dispar*
7	รูปแฉกแบบนิ้วมือ	*P. caerulea* 'Emil Kugler'
8	รูปหัวใจ	*P. auriculata*, *P. holosericea*
9	รูปกลม	*P. subrotunda*
10	สามเหลี่ยมข้าวหลามตัด	*P. suberosa*II
11	รูปเงี่ยงใบหอก	*P. obtusifolia*, *P. gardneri*, *P. foetida*, *P. amethystina*II, *P. pallida*, *P. amethystina* 'Cardoso Moreira', *P. foetida* 'Albiflora', *P. suberosa*
12	มีรูปร่างหลายแบบ	*P. racemosa*, *P. edulis* var. *flavicarpa*

หมายเหตุ กลุ่มที่ 12 มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ *P. racemosa* มีรูปร่างใบ 3 แบบคือรูปไข่ รูปเงี่ยงใบหอกและสองแฉกด้านข้าง ส่วน *P. edulis* var. *flavicarpa* มีรูปร่างแบบสามแฉกหยักลึก รูปไข่และสองแฉกด้านข้าง

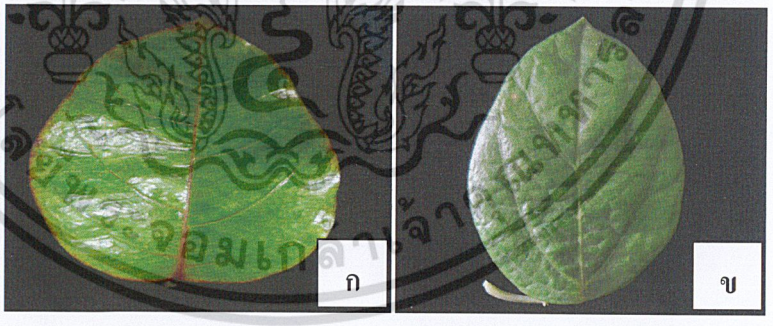
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงรูปร่างใบสองแฉกในกลุ่มที่ 3 ก. *P. micropetala* ข. *P. fledermouse* และ ค. *P. capsularis*

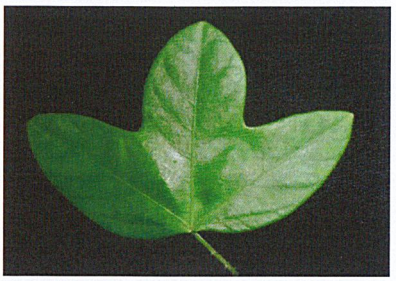


รูปที่ 4.2 แสดงรูปร่างใบแบบเรียวยาวด้านข้างในกลุ่มที่ 4 ก. *P. sexocellata* และ ข. *P. coriacea*



รูปที่ 4.3 แสดงรูปร่างใบเป็นแบบรูปไข่ในกลุ่มที่ 6 ก. *P. laurifolia* และ ข. *P. dispar*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงรูปร่างใบแบบรูปเงี่ยงใบหอกในกลุ่มที่ 11 *P. amthystina* 'Cardoso Moreira'

ตารางที่ 4.2 การจัดจำแนกตามลักษณะปลายใบ

กลุ่มที่	ปลายใบ	สายพันธุ์
1	ปลายตัด	*P. sexocellata*
2	ปลายเว้า	*P. mucronata*
3	ปลายติ่งแหลม	*P. dispar*, *P. arida*, *P. edulis* var. *flavicarpa*
4	ปลายแหลม	*P. auriculata*, *P. obtusifolia*, *P. gardneri*, *P. foetida*, *P. racemosa*, *P. coccinea*, *P. pallida*, *P. suberosa*II
5	ปลายเว้าตื้น	*P. yucatanensis*, *P. cupraea*, *P. subrotunda*, *P. micropetala*, *P. coriacea*, *P. tricuspis*
6	ปลายมน	*P. lutea*, *P. truneata*
7	ปลายติ่งหนาม	*P. perfoliata*, *P .misera*, *P. holosericea*, *P. rubra*, *P. quinquangularis*, *P. urnaefolia*, *P. talamancensis*, *P. fledermouse*, *P. biflora*, *P. spiucei*, *P. amethystina*II, *P. amethystina* (Cardoso Moreira), *P. foetida albiflora*, *P. laurifolia*, *P. capsularis*, *P. trifasciata*, *P. suberosa*, *P. emily kugler*, *P. edmundoi*
8	ปลายเรียวแหลม	*P. edulis* var. *flavicarpa*

หมายเหตุ *P. edulis* var. *flavicarpa* มีปลายใบ 2 แบบคือปลายเรียวแหลมและปลายติ่งแหลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกตามลักษณะขอบใบ

กลุ่มที่	ขอบใบ	สายพันธุ์
1	ขอบจักฟันเลื่อยซ้อน	*P. coccinea*
2	ขอบหยักเป็นคลื่น	*P. mucronata, P. coriacea, P. edulis* var. *flavicarpa*
3	ขอบเป็นขนครุย	*P. foetida* 'Albiflora', *P. capsularis*
4	ขอบหยักเว้าพู	*P. lutea, P. gardneri, P. foetida, P. truncata, P. suberosa*II
5	ขอบหยักลึกแฉกแบบนิ้วมือ	*P. caerulea* 'Emil Kugler', *P. arida*
6	ขอบเป็นแฉก	*P. obtusifolia, P. racemosa, P. sprucei, P. amethystina*II, *P. pallida, P. amethystina* 'Cardoso Moreira', *P. edulis* var. *flavicarpa, P. trifasciata, P. tricuspis, P. suberosa, P edmundoi*
7	ขอบเรียบ	*P. yucatanensis, P. perfoliata, P. misera, P. cupraea, P. auriculata, P. subrotunda, P. holosericea, P. micropetala, P. rubra, P. quinquangularis, P. urnaefolia, P. talamancensis, P. sexocellata, P. fledermouse, P .racemosa, P. biflora, P. laurifolia, P. dispar*
8	ขอบจักฟันเลื่อย	*P. edulis* var. *flavicarpa*

หมายเหตุ *P. racemosa* มีขอบใบ 2 แบบคือ ขอบเป็นแฉกและขอบเรียบ ส่วน *P. edulis* var. *flavicarpa* มีขอบใบ 3 แบบคือ ขอบหยักเป็นคลื่น ขอบเป็นแฉกและขอบจักฟันเลื่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การจัดจำแนกตามลักษณะโคนใบ

กลุ่มที่	โคนใบ	สายพันธุ์
1	โคนใบรูปหุ้มลำต้น	*P. perfoliata*
2	โคนใบรูปลิ่ม	*P. sexocellata*, *P. coriacea*, *P. dispar*
3	โคนใบเบี้ยว	*P. quinquangularis*
4	โคนใบรูปเงี่ยงใบหอก	*P. amethystina*II, *P. caerulea* 'Emil Kugler'
5	โคนใบตัด	*P. auriculata*, *P. holosericea*, *P. racemosa*, *P. amethystina* 'Cardoso Moreira', *P. caerulea* 'Emil Kugler'
6	โคนใบรูปแหลม	*P. talamancensis*, *P. obtusifolia*, *P. biflora*, *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. trifasciata*, *P. tricuspis*
7	โคนใบรูปติ่งหู	*P. rubra*, *P. coccinea*, *P. foetida* 'Albiflora', *P. capsularis*, *P. arida*
8	โคนใบมน	*P. yucatanensis*, *P. misera*, *P. cupraea*, *P. micropetala*, *P. urnaefolia*, *P. truneata*, *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. laurifolia*
9	โคนใบรูปหัวใจ	*P. subrotunda*, *P. mucronata*, *P. lutea*, *P. gardneri*, *P. foetida*, *P. fledermouse*, *P. racemosa*, *P. sprucei*, *P .pallida*, *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. suberosa*II, *P. suberosa*, *P. edmundoi*

หมายเหตุ *P.racemosa* มีโคนใบ 2 แบบคือ โคนใบตัดและโคนใบรูปหัวใจ *P.edulis* var. *flavicarpa* มีโคนใบ 3 แบบคือ โคนใบรูปแหลม โคนใบมนและโคนใบรูปหัวใจ ส่วน *P. caerulea* 'Emil Kugler' มีโคนใบ 2 แบบคือ โคนใบรูปเงี่ยงใบหอกและโคนใบตัด

4.1.2 ผลการศึกษาในระดับโมเลกุล

4.1.2.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของตัวอย่างพืชสกุล *Passiflora* ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF1 แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จะมีค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis แล้วเทียบขนาดดีเอ็นเอกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส

ตารางที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ของตัวอย่าง 12 สายพันธุ์

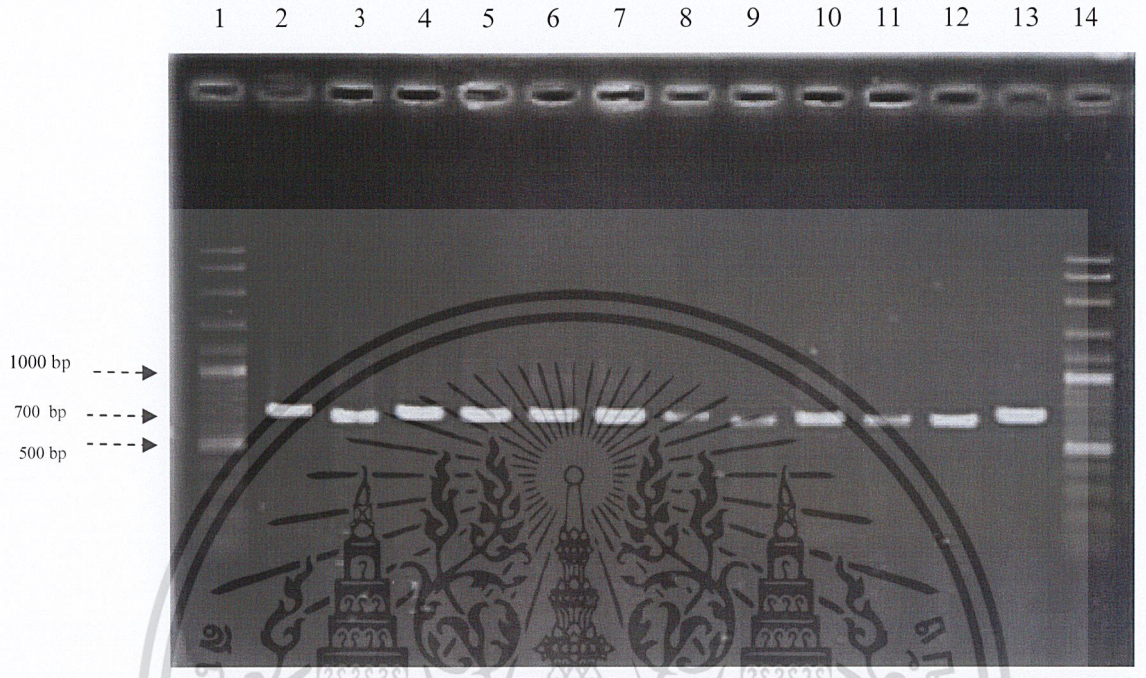
รหัสตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
SAO 01	*P.yucatanensis*	0.024	0.018	120
SAO 07	*P.mucronata*	0.030	0.021	150
SAO 09	*P.micropetala*	0.029	0.020	145
SAO 15	*P.sexocellata*	0.019	0.014	95
SAO 19	*P.fledermouse*	0.021	0.014	105
SAO 21	*P.biflora*	0.022	0.015	110
SAO 25	*P.coriacea*	0.018	0.012	90
SAO 27	*P.amethystina* 'Cardoso Moreira'	0.045	0.031	225
SAO 29	*P.foetida* 'Albiflora'	0.020	0.013	100
SAO 31	*P.laurifolia*	0.014	0.009	70
SAO 32	*P.capsularis*	0.025	0.017	125
SAO 37	*P.dispar*	0.018	0.015	90

4.1.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในพืชสกุล *Passiflora* ทั้ง 12 สายพันธุ์ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง ITS บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ลำดับเบสและมีความผันแปรสูงกว่าบริเวณอื่น จึงนำมาใช้ประโยชน์ในเรื่องการจำแนกชนิดหรือหาความหลากหลายของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1 *Passiflora* forward ซึ่งมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ดังนี้ไพรเมอร์ 5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3' และไพรเมอร์ ITS 2 *Passiflora* reverse 5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3' พบว่าไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในตัวอย่างทั้งหมด 12 สายพันธุ์คือ *P. yucatanensis, P. biflora, P. mucronata, P. micropetala, P. sexocellata, P. fledermouse, P. coriacea, P. amethystina*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

'Cardoso Moreira', *P. foetida* 'Albiflora' , *P. laurifolia, P. capsularis* และ *P. dispar* โดยผลที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในตำแหน่ง ITS แสดงดังในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในบริเวณ ITS โดยแถวที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 2 คือ *P. yucatanensis* แถวที่ 3 คือ *P. mucronata* แถวที่ 4 คือ *P. micropetala* แถวที่ 5 คือ *P. sexocellata* แถวที่ 6 คือ *P. fledermouse* แถวที่ 7 คือ*P. biflora* แถวที่ 8 คือ *P. coriacea* แถวที่ 9 คือ *P. amethystina* 'Cardoso Moreira', แถวที่ 10 คือ *P. foetida* 'Albiflora' แถวที่ 11 คือ *P. laurifolia* แถวที่ 12 คือ *P. dispar* แถวที่ 13 คือ *P. capsularis* แถวที่ 14 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

จากผลการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในตำแหน่ง ITS จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 650-700 คู่เบส ซึ่งมีขนาดที่ใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง

4.1.2.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora*

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง ITS บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอทั้งหมด 12 สายพันธุ์ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

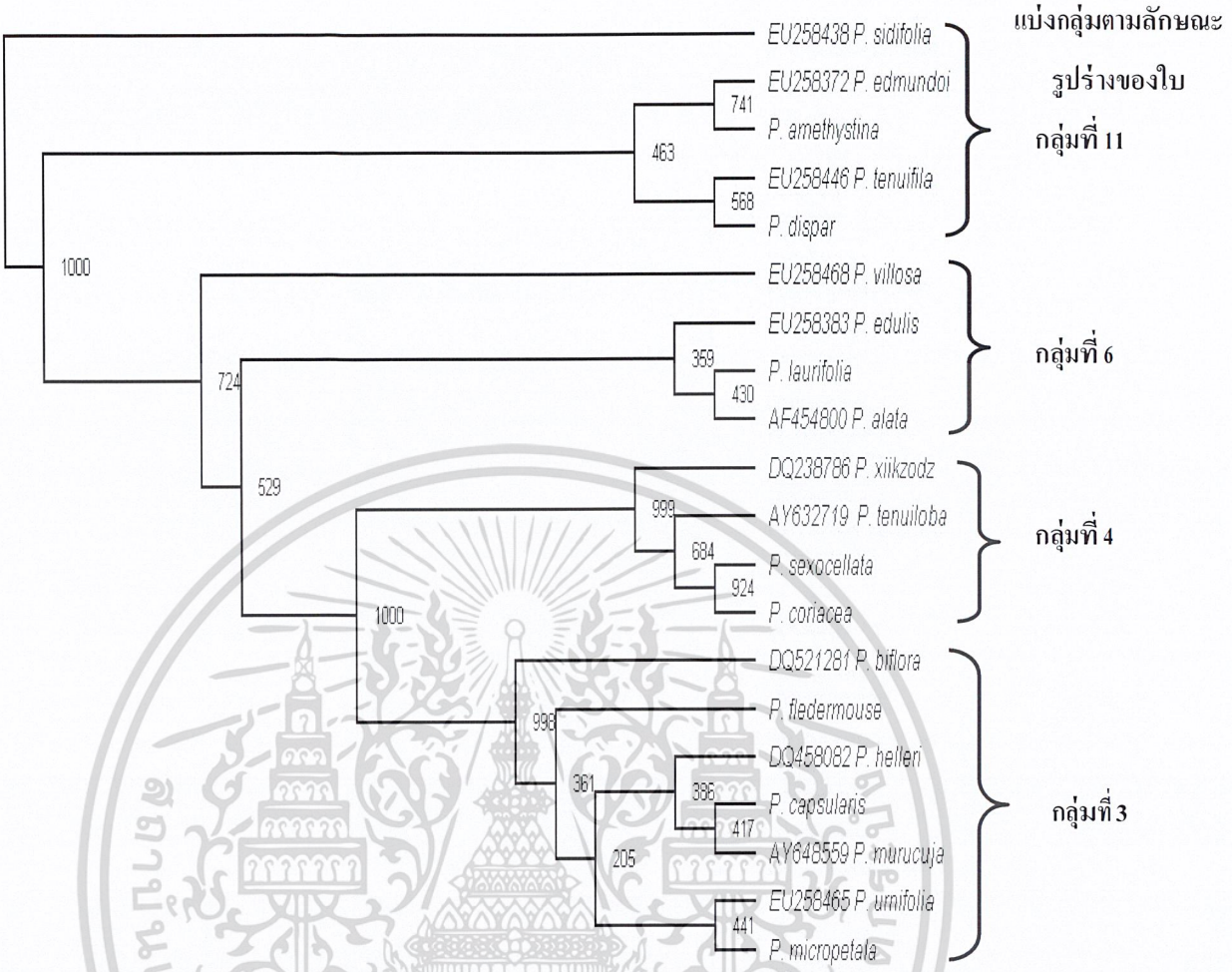
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา

ด้วยชุดโปรแกรม Phylip มีเพียง 8 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้คือ *P. micropetala, P. sexocellata, P. fledermouse*, *P. coriacea*, *P. amethystina* 'Cardoso Moreira', *P. laurifolia*, *P. capsularis* และ *P. dispar* เนื่องจากอีก 4 สายพันธุ์มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นกว่า 200 คู่เบส จึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Passiflora* จากตัวอย่างทั้งหมด 8 สายพันธุ์นั้นเพื่อยืนยันผลในการจำแนกความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* จึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ (ภาคผนวก) มาวิเคราะห์ร่วมด้วย (Valéria และคณะ, 2003 ; Yockteng และ Nadot , 2004)

เมื่อทำการตัดความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit และวิเคราะห์ความแตกต่างในการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalX ตัวอย่างทั้งหมด 20 สายพันธุ์มีความยาวลำดับนิวคีโอไทด์ 268 คู่เบส นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยชุดโปรแกรม Phylip ซึ่งสามารถสร้างเป็นแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ของพืชสกุล *Passiflora* และแสดงค่า bootstrapping value ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชุดข้อมูลซ้ำ (boostripping) 1000 ครั้ง บนแผนภูมิได้ (รูปที่ 4.6)

ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* บริเวณตำแหน่ง ITS บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ แสดงผลในรูปแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถจำแนกความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ทั้ง 8 สายพันธุ์ออกได้เป็น 4 กลุ่มที่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 4.6) โดยเปรียบเทียบเพื่อยืนยันผลการจำแนกความแตกต่างบนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ที่ได้ร่วมกับกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบและแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ในงานวิจัยอื่น (Valéria และคณะ, 2003 ; Yockteng และ Nadot , 2004) โดยพืชสกุล *Passiflora* ทั้ง 8 สายพันธุ์มีแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่จำแนกกลุ่มได้ดังต่อไปนี้ คือ กลุ่ม *P. micropetala, P. fledermouse* และ *P. capsularis* มีลักษณะรูปร่างใบสองแฉกเว้าเข้าบริเวณกลางของปลายใบจึงจัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่มที่ 3 *P. sexocellata* และ *P. coriacea* มีลักษณะรูปร่างใบแบบเรียวยาวด้านข้างที่เหมือนกันจึงจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มที่ 4 *P. laurifolia* ลักษณะรูปร่างใบเป็นแบบรูปไข่จัดจำแนกอยู่ในกลุ่มที่ 6 *P. amethystina* 'Cardoso Moreira' และ *P. dispar* มีลักษณะรูปร่างใบแบบรูปเงี่ยงใบหอกจัดอยู่ในกลุ่ม 11 แต่ผลการจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า *P. dispar* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้ชิดกับ *Passiflora* ในกลุ่มที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* ตำแหน่ง ITS บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) พร้อมแสดงค่า bootstrapping value ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชุดข้อมูลซ้ำ 1000 ครั้ง และจัดจำแนกกลุ่มร่วมกับลักษณะรูปร่างของใบ สามารถจำแนกออกได้เป็น 4 กลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเนื้อเยื่อลำต้นและใบให้เจริญเป็นแคลลัส

จากการนำลำต้นและใบของ *Passiflora* พันธุ์ลูกผสมจากสวนจตุจักร 1 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงเปรียบเทียบกับสภาวะที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในสภาวะที่มีแสง อาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำส่วนของลำต้นและใบให้เจริญเป็นแคสลัสได้ แสดงดังรูปที่ 4.7 ก.-ง. และรูปที่ 4.8 ก.-ง. ตามลำดับ โดยอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7 ก.) สามารถชักนำให้ลำต้นเกิดแคลลัสได้สูงสุดร้อยละ 68 ของการเกิดแคลลัส เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ใส่ BA ที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุดร้อยละ 16 ของการเกิดแคลลัส บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.8 ข.)

ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้นและใบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดังรูปที่ 4.9 ก.-ง. และรูปที่ 4.10 ก.-ง. ตามลำดับ พบว่าทั้งลำต้นและใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ปริมาณสูงที่ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.9 ง. และ 4.10 ง.) คิดเป็นร้อยละ 100 ของการเกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้น และร้อยละ 4 ของการเกิดแคลลัสจากส่วนของใบ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 แต่เมื่อเพาะเลี้ยงใบต่อไปอีกใบจะมีลักษณะสีซีดเหลืองและไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส ที่ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต2,4-D 0.5, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำใบให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ในสภาวะที่มืด ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อลำต้นและใบซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แสดงดังรูปที่ 4.11 ก.-ง. และรูปที่ 4.12 ก.-ง. ตามลำดับ โดยอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุดร้อยละ 60 และร้อยละ 68 ของการเกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้นและใบ ซึ่งลักษณะแคลลัสที่ได้ดังรูปที่ 4.11 ก. และ 4.12 ข. ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อลำต้นและใบ แสดงดังรูปที่ 4.13 ก.-ง. และรูปที่ 4.14 ก.-ง.ตามลำดับ พบว่าเนื้อเยื่อลำต้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุดในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.13 ค.) คิดเป็นร้อยละ 84 ของการเกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้นดังแสดงในตารางที่ 4.7 ส่วนใบชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุดร้อยละ 40 ของการเกิดแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.14 ง.)

จะเห็นได้ว่าในการชักนำลำต้นให้เกิดแคลลัสนั้น ทั้งในสภาวะที่มีแสงและที่มืดให้ผลเหมือนกันคือ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัส ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D นั้น พบว่าในสภาวะที่มีแสงสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน มีคุณสมบัติส่งเสริมการแบ่งเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการสร้างแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัส นอกจากนี้ยังมีความคงสภาพได้ดีเพราะไม่ถูกทำลายด้วยแสงเมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ซึ่งอาจเป็นพิษต่อเซลล์ (อุดม, 2549)

ส่วนการชักนำใบให้เกิดแคลลัสนั้น ทั้งในสภาวะที่มีแสงและที่มืดพบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ควรใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Otahola ที่พบว่าใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และจะมีการสร้างแคลลัสในวันที่ 15, 25 และ 35 หลังการเพาะเลี้ยง แต่การทดลองที่ได้นั้นพบว่าในสภาวะที่มืดให้ผลการชักนำแคลลัสได้ดีกว่าเพราะไม่มีผลกระทบจากแสง

สำหรับอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D พบว่าไม่เหมาะสมในการชักนำใบให้เกิดแคลลัส เพราะว่าถ้ามีแสง แสงจะส่งเสริมให้ใบมีการสร้างคลอโรฟิลล์และการเกิดยอดมากกว่าการสร้างแคลลัส ถึงแม้ว่าในสภาวะที่มืด บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้น 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ร้อยละการเกิดแคลลัสสูงสุดก็ตาม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้ว พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้น 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ร้อยละการเกิดแคลลัสน้อยกว่า ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับชักนำ

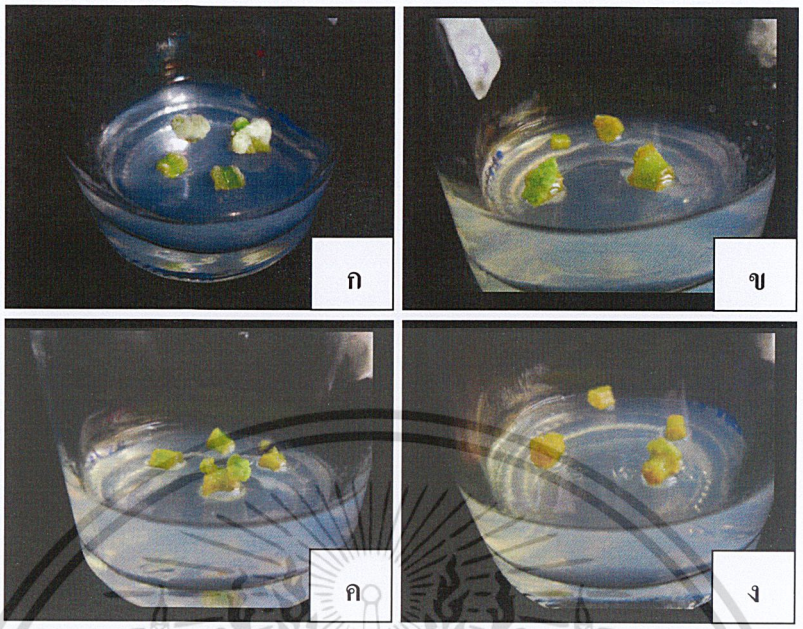
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบให้เกิดแคลลัสคือที่มืด ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.6 ร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อลำต้นและใบในสภาวะที่มีแสง บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)		ร้อยละการเกิดแคลลัส (ชิ้น)	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
BA 0.5	17	2	68	8
BA 1	5	4	20	16
BA 3	2	2	8	8
BA 5	4	3	16	12
2,4-D 0.5	21	ไม่เกิดแคลลัส	84	ไม่เกิดแคลลัส
2,4-D 1	19	ไม่เกิดแคลลัส	76	ไม่เกิดแคลลัส
2,4-D 3	17	ไม่เกิดแคลลัส	68	ไม่เกิดแคลลัส
2,4-D 5	25	1	100	4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะลำต้นที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีแสง

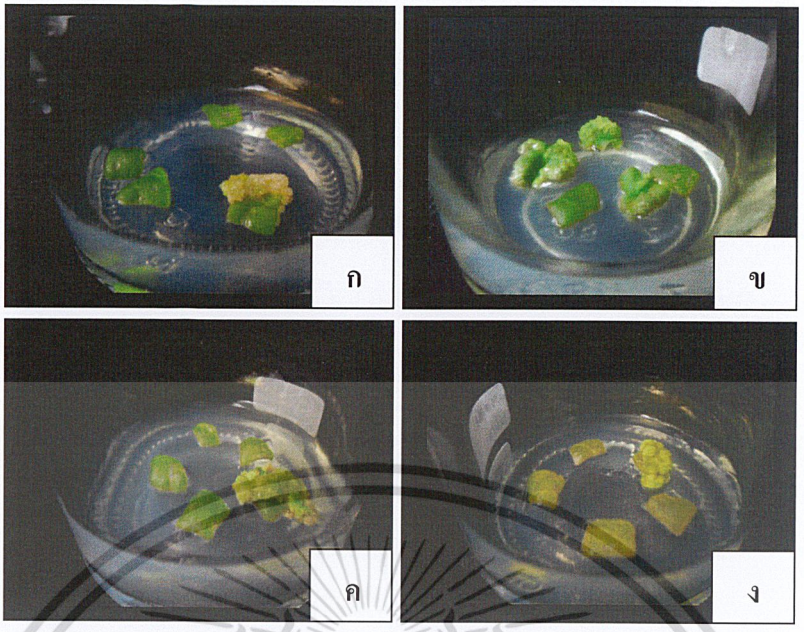
ก. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะใบที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีแสง

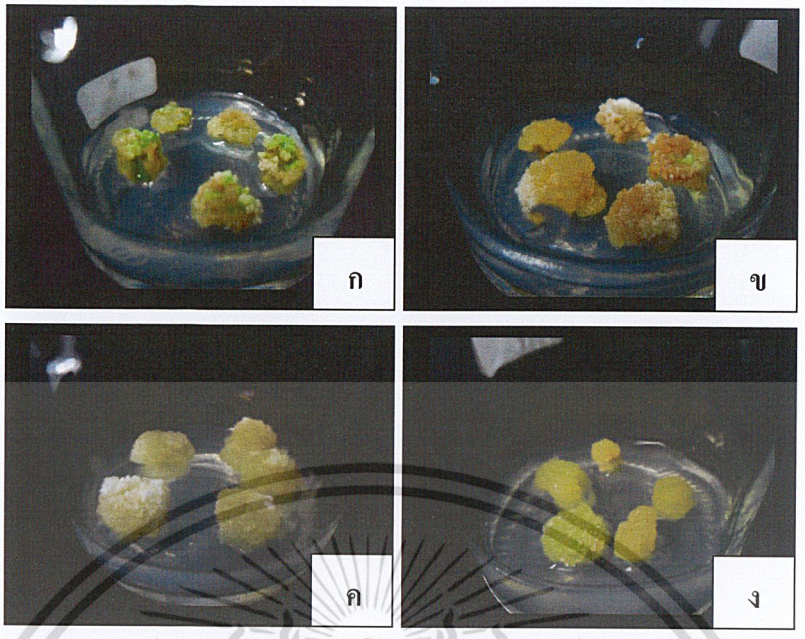
ก. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะลำต้นที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีแสง

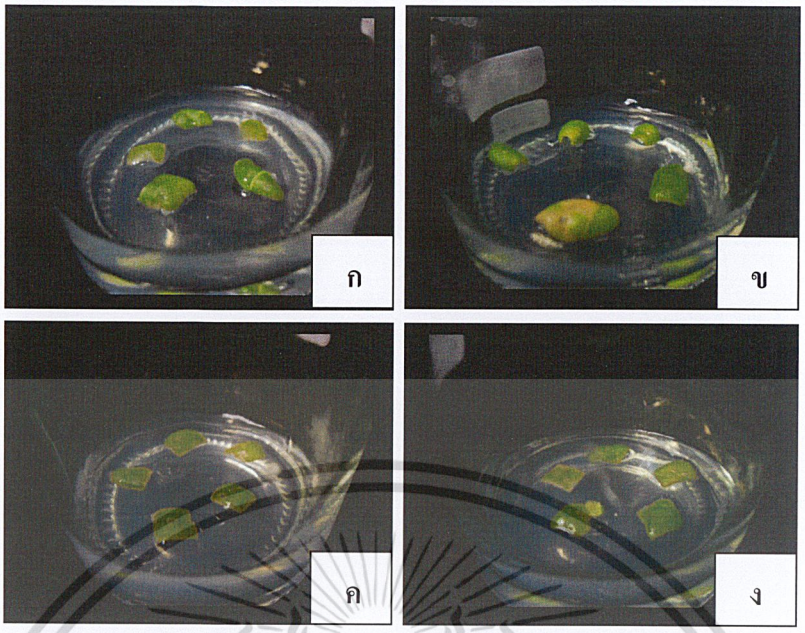
ก. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะใบที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีแสง

ก. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

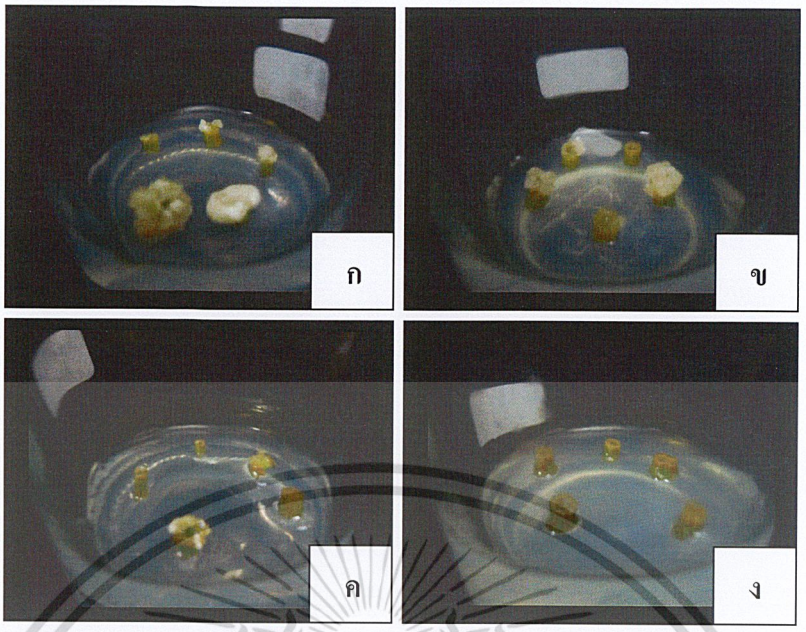
ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อลำต้นและใบในสภาวะที่มืด บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)		ร้อยละการเกิดแคลลัส (ชิ้น)	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
BA 0.5	15	17	60	68
BA 1	8	12	32	48
BA 3	3	6	12	24
BA 5	2	5	8	20
2,4-D 0.5	18	ไม่เกิดแคลลัส	72	ไม่เกิดแคลลัส
2,4-D 1	9	ไม่เกิดแคลลัส	36	ไม่เกิดแคลลัส
2,4-D 3	21	6	84	24
2,4-D 5	20	10	80	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะลำต้นที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มืด

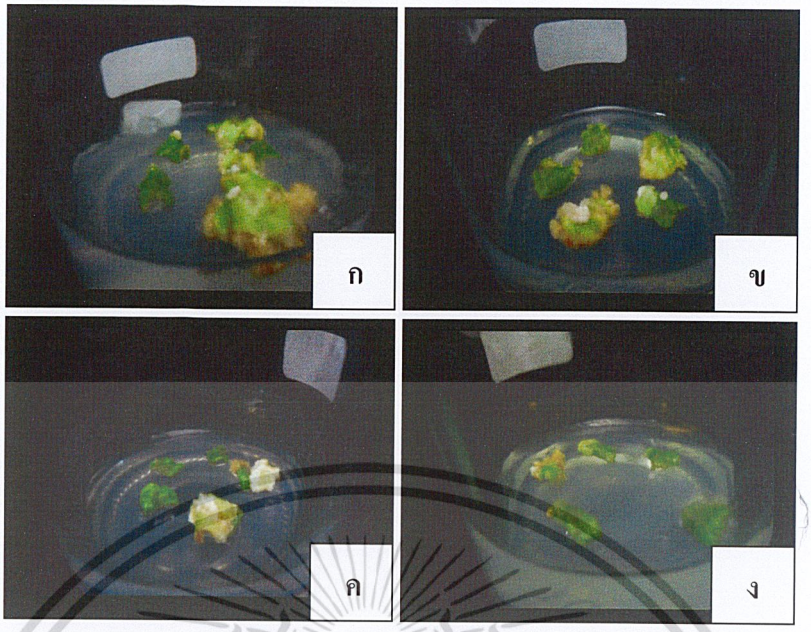
ก. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะใบที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มืด

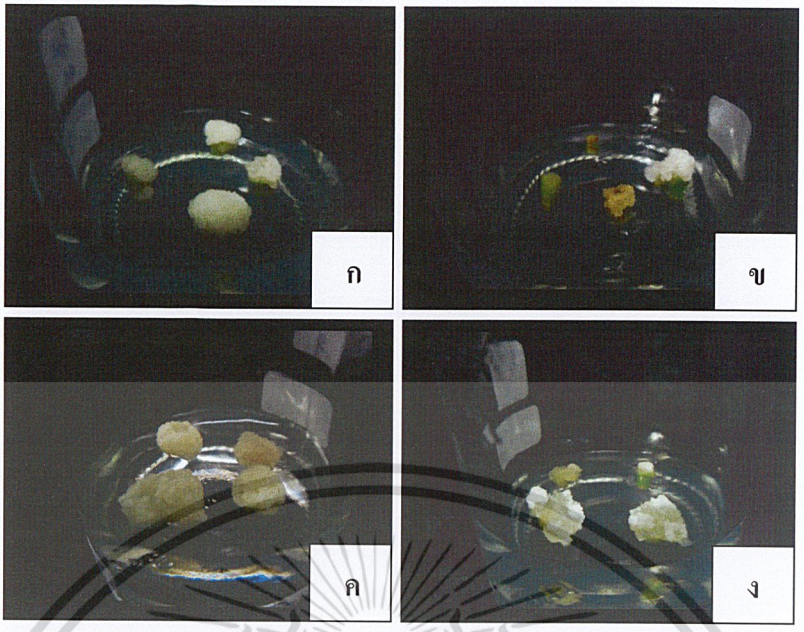
ก. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะลำต้นที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มืด

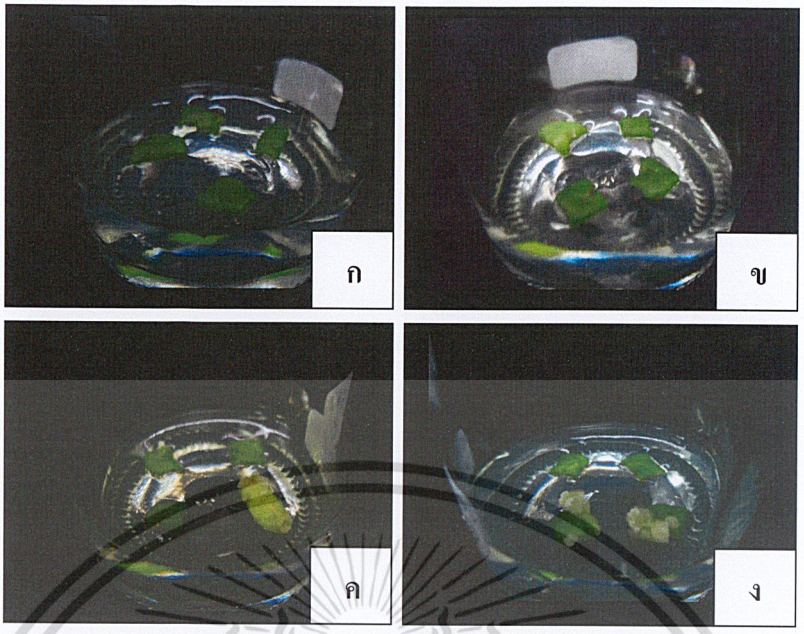
ก. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะใบที่พัฒนาเป็นแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มืด

ก. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

จากการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เมื่อนำเอาแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนของลำต้น ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มืด เนื่องจากแคลลัสที่ได้จากอาหารดังกล่าวจะสังเกตเห็นว่ามีลักษณะแข็งแรง เป็น compact callus ซึ่งนิยมนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอย เพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 วัน ตามลำดับ แล้วตรวจสอบการเจริญด้วยการวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งได้ผลดังตารางที่ 4.8 พบว่าเซลล์จะมีอัตราการเจริญน้อยมากในช่วงแรกคือวันที่ 0 ถึง 12 ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์เริ่มปรับตัวเข้ากับอาหารเพาะเลี้ยงและสภาพแวดล้อมจึงมีการแบ่งเซลล์เพียงเล็กน้อย จากนั้นเซลล์จะ

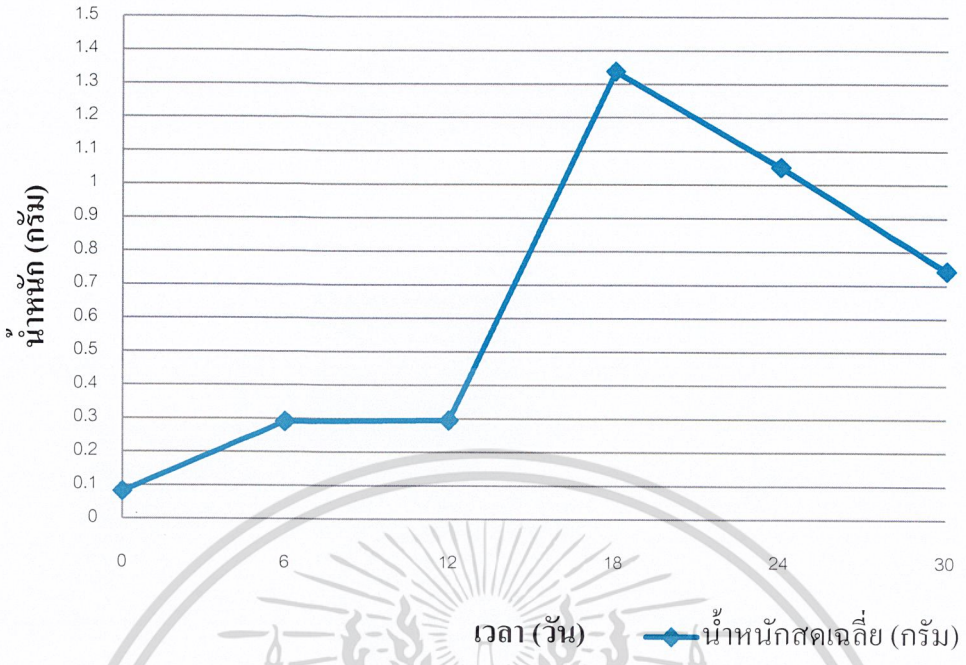
เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

เจริญอย่างรวดเร็วในวันที่ 12 และเพิ่มจำนวนสูงที่สุดในวันที่ 18 โดยในช่วงนี้เป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการเจริญสูงสุดและใช้อาหารที่มีอยู่ในการเพิ่มจำนวนทำให้กราฟที่ได้มีความชันเพิ่มสูงขึ้นตามเวลา จากนั้นลดจำนวนลงจนจนถึงวันที่ 30 ซึ่งเป็นผลมาจากปัจจัยภายนอกอื่นๆ เช่น ลักษณะของเซลล์เริ่มต้นเพาะเลี้ยง สารอาหารเริ่มหมด และเริ่มมีการสร้างสารพิษต่อเซลล์ขึ้น (รูปที่ 4.15 และ รูปที่ 4.16) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Khiet และคณะ ที่พบเซลล์แขวนลอยมีการเจริญสูงสุดในช่วงวันที่ 15 และลดต่ำลงในวันที่ 20 ก่อนที่จะเข้าสู่สภาวะคงที่

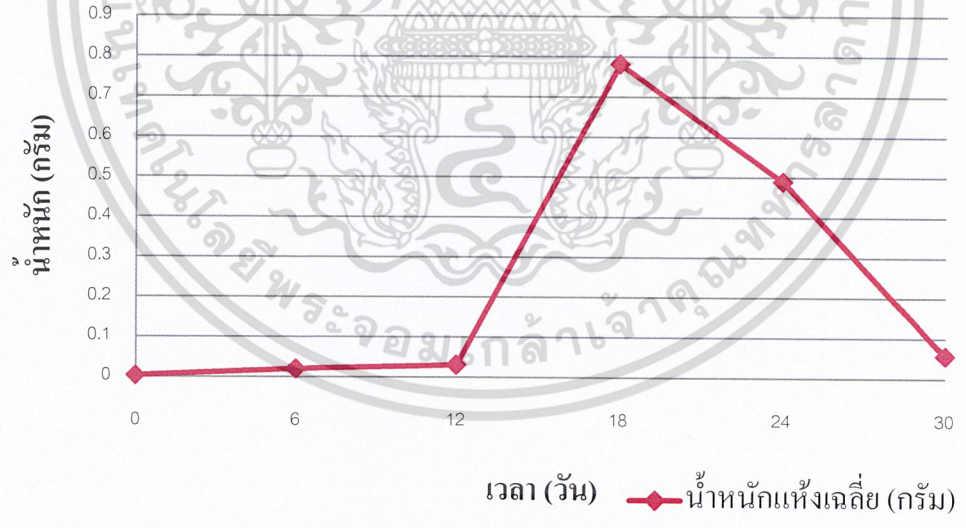
ตารางที่ 4.8 ค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

วันที่	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัม)
0	0.0826	0.0038
6	0.2914	0.0202
12	0.2954	0.0310
18	1.3378	0.7813
24	1.0523	0.4895
30	0.7433	0.0568

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 แสดงกราฟระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของแคลลัส *Passiflora* พันธุ์ลูกผสม โดยวิธีการหาน้ำหนักสด



รูปที่ 4.16 แสดงกราฟระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของแคลลัส *Passiflora* พันธุ์ลูกผสม โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชในสกุล *Passiflora* จำนวน 40 สายพันธุ์ พบว่าพืชสกุลนี้มีความหลากหลายและแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ มีลักษณะเด่นเฉพาะตัวของสายพันธุ์นั้น ๆ แต่โดยส่วนใหญ่แล้วพืชสกุลนี้จะมีชนิดของใบเป็นแบบใบเดี่ยว มีลักษณะหูใบเป็นแบบหูใบอิสระข้างก้านใบ มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีลักษณะหูใบแบบหูใบแผ่ออกคล้ายใบและลักษณะหูใบแบบหูใบระหว่างก้านใบ สำหรับการจัดเรียงตัวของใบบนลำต้นนั้นเป็นแบบสลับ ยกเว้น *P. mucronata* และ *P. lutea* มีการจัดเรียงตัวของใบบนลำต้นเป็นแบบเรียงเวียน เส้นใบที่พบมี 3 แบบ คือ การเรียงเส้นใบย่อยร่างแหแบบนิ้วมือ การเรียงเส้นใบย่อยร่างแหแบบขนนก ยกเว้น *P. caerulea* 'Emil Kugler' มีการเรียงเส้นใบย่อยร่างแหแบบนิ้วมือชนิดแยกออกจากกัน ลักษณะมือจับพบได้ในทุกสายพันธุ์แต่จะมีสีและลักษณะการม้วนตัวต่างกัน ต่อมบนใบ มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มี ซึ่งต่อมจะอยู่บนแผ่นใบ แต่จะมีบางสายพันธุ์มีต่อมอยู่บริเวณขอบใบ โดยลักษณะการเรียงตัวของต่อม จำนวนต่อม ขนาดและสีจะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ ส่วนต่อมบนก้านใบจะมีลักษณะเฉพาะและมีเพียงบางสายพันธุ์ที่ไม่มีต่อมบนก้านใบ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาลักษณะรูปร่างใบ ปลายใบ ขอบใบ และโคนใบ ยังพบว่ามีลักษณะหลายรูปแบบ ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มดังนี้คือ รูปร่างใบจำนวน 12 กลุ่ม ปลายใบ 8 กลุ่ม ขอบใบ 8 กลุ่ม และโคนใบ 9 กลุ่ม มีพืชสกุล *Passiflora* บางสายพันธุ์ คือ *P. racemosa, P. edulis* var. *flavicarpa* และ *P. caerulea* 'Emil Kugler' มีลักษณะหลายแบบอยู่ในสายพันธุ์เดียวกัน ทำให้สามารถจัดจำแนกออกได้เป็นหลายกลุ่ม โดย *P. racemosa* มีรูปร่างใบแบบรูปไข่ รูปเงี่ยงใบหอก และแบบสองแฉกด้านข้าง มีลักษณะขอบใบแบบขอบเป็นแฉกและขอบเรียบ ลักษณะโคนใบแบบโคนใบตัดและโคนใบรูปหัวใจ ส่วน *P. edulis* var. *flavicarpa* มีรูปร่างใบแบบสามแฉกหยักลึก รูปไข่และแบบสองแฉกด้านข้าง มีลักษณะปลายใบแบบปลายเรียวแหลมและปลายติ่งแหลม ลักษณะขอบใบแบบขอบหยักเป็นคลื่น ขอบเป็นแฉกและขอบจักฟันเลื่อย ลักษณะโคนใบแบบโคนใบรูปแหลม โคนใบมนและโคนใบรูปหัวใจ ส่วน *P. caerulea* 'Emil Kugler' นั้นมีลักษณะโคนใบแบบโคนใบรูปเงี่ยงใบหอกและโคนใบตัด

ผลการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* บริเวณ ITS บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1 *Passiflora* และ ITS 2 *Passiflora* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้นั้นมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส และมีเพียง 8 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถนำมาวิเคราะห์แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลนี้ได้ โดย

เอกสารนี้ไม่ได้ห้ามการใช้งานเพื่อการศึกษา แต่ห้ามการใช้งานเพื่อประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น การอ้างอิงควรอ้างอิงถึงต้นฉบับ

วิเคราะห์ร่วมกับกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปร่างใบ สามารถจำแนกความแตกต่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม *P. micropetala*, *P. fledermouse* และ *P. capsularis* จัดอยู่ในลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปร่างใบกลุ่มที่ 3 กลุ่ม *P. sexocellata* และ *P. coriacea* จัดอยู่ในลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปร่างใบกลุ่มที่ 4 กลุ่ม *P. laurifolia* จัดอยู่ในลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปร่างใบกลุ่มที่ 6 กลุ่ม *P. amethystina* 'Cardoso Moreira' และ *P. dispar* จัดอยู่ในลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปร่างใบกลุ่มที่ 11 แต่จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า *P. dispar* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 6 มากกว่ากลุ่มที่ 11 นอกจาก *P. dispar* แล้วพบว่า *Passiflora* ทั้ง 7 สายพันธุ์จะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องร่วมกับผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สำหรับการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเนื้อเยื่อลำต้นและใบให้เจริญเป็นแคลลัสนั้น เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีแสงพบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำลำต้นให้เจริญเป็นแคลลัสได้สูงที่สุดร้อยละ 100 ส่วนใบสามารถชักนำให้เจริญเป็นแคลลัสได้สูงสุดในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นของ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 16 สำหรับในสภาวะที่มืดนั้นในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำลำต้นให้เจริญเป็นแคลลัสได้สูงสุดร้อยละ 84 ส่วนใบสามารถชักนำให้เจริญเป็นแคลลัสได้สูงที่สุดในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68 แต่เมื่อพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดแล้วพบว่าการชักนำลำต้นให้เจริญเป็นแคลลัสนั้นควรเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใบควรเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มืด บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยโดยการวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าในช่วง 12 วันแรก เซลล์จะมีอัตราการเจริญอย่างช้า ๆ (lag phase) และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 12 ถึง 18 (log phase) และวันที่ 18 เป็นระยะเวลาที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด จากนั้นเซลล์จะค่อย ๆ ลดจำนวนลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต. 2545. คู่มือการจำแนกพันธุ์ไม้. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ : บริษัทประชาชน จำกัด.

ชุมพล คุณวาสี. 2551. สันฐานวิทยาเบื้องต้นในการระบุชื่อวงศ์พืชดอกสามัญ. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราพร วีระพลากร. 2552. พันธุศาสตร์ของพืช. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลันรามคำแหง

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. เทคโนโลยีชีวภาพของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : หจก.วี.เจ.พริ้นติ้ง

อุดม นวพาณิช. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง

Abreu, P., Souza, M., Santos, E. and Pires, M. 2008. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. Euphytica 166: 307-315.

Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F. and Biondi, S. 2007. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. Fitoterapia 78: 345-352.

Crochemore, M.L., Molinari, H.B.C. and 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.

Desfeux, C. and Lejeune, B. 1996. Systematices of euromediterranean *Silene* (Caryophllaceae) evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequence. Competes Rendus Academie des Sciences Pairs 319: 351-358.

Isutsa, D.K. 2004. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. Scientia horticulturae. 99: 395–400.

Kawata, K., Ushida, C., Kawai, F., Kanamori, M. and Kuriyama, A. 1995. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. Journal of plant physiology. 147: 281-284.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khiet, B.L.T., Thi, N.N., Huyen, P.X. and Nhut D.T. 2006. Primary study of cell suspension culture of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa*). Proceedings of international workshop on biotechnology in agriculture. 113-114.

Krosnick, S.E. and Freudenstein, J.V. 2005. Monophyly and floral character homology of old world *Passiflora* (subgenus decaloba: supersection disemma). Systematic Botany. 30: 139–152.

Lombardi, S.P., Passos, I.R.S., Nogueira, M.C.S. and Glória, B.A. 2007. In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* mast. Brazilian Archives of Biology and Technology. 50: 239-247.

Mäder, G., Zamberlan P.M., Fagundes N.J.R., Magnus T., Salzano F.M., Bonatto S.L. and Freitas, L.B. 2010. The use and limits of ITS data in the analysis of intraspecific variationin *Passiflora* L. (Passifloraceae). Genetics and molecular biology 33: 99-108.

Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15. 473-497

Muschner, V.C., Lorenz-Lemke A.P., Vecchia M., Bonatto S.L., Salzano F.M. and Freitas L.B. 2006. Differential oraganellar inheritance in *Passiflora*'s (Passifloraceae) subgenus. Genetica 128: 449-453.

Otahola, V. 2000. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) a partir del cultivo in vitro de discos de hojas. Bioagro 12: 71-74.

Sousa, J.S.I. and Meletti, L.M.M. 1997. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Pircicaba: FEALQ. 179.

Valeria, C.M., Aline, P.L.L., Sandro, L.B., Armando C.C., Tatiana T.S., Francisco, M.S. and Loreta, B.F. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). American journal of Botany. 90: 1229-1238.

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

Yockteng, R. and Nadot, S. 2004. Infrageneric phylogenies acomparison of chloroplast-expressed glutamine synthetase, cytosol-expressed glutamine synthetase and cpDNA maturase K in *Passiflora*. Molecular phylogenetic and evolution. 31: 397-402.

[Online].Available : http://thaigoodview.com/node/50742 (5 กรกฎาคม 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm (14 กันยายน 2553)

[Online].Available : http://bkw.ac.th/content/snet4/genetics/pcr.htm (23 กันยายน 2553)

[Online].Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Passion_flower (18ตุลาคม2553)

[Online].Available : http://www.passionflow.co.uk/passiflora-passion-flower-virus.htm (18 ตุลาคม 2553)

[Online].Available : http://www.barascientific.com/article/DNA/images/DNA-06.jpg (29 กันยายน 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวัดค่าการดูดกลืนแสงจากดีเอ็นเอที่สกัดได้

การวัดค่าการดูดกลืนแสงจะวัดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยการวัดที่ 260 นาโนเมตร จะเป็นการวัดเพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอและที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จะเป็นการวัดเพื่อหาปริมาณโปรตีน โดยที่โครงสร้างในส่วนของเบสพิวรีนและไพริมิดีนเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการดูดกลืนแสง

การวัดค่าการดูดกลืนแสงจะวัดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และนำมาหาค่า Ratio O.D. 260/280 เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

O.D. 260/280 = 1.8 – 2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอบริสุทธิ์

O.D. 260/280 > 2.0 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อน

O.D. 260/280 < 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน

ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสง

1. ทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 495 ไมโครลิตร และใส่ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร
2. นำไป vortex และ spindown
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นค่ามาตรฐาน

การคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ

1. หาปริมาณดีเอ็นเอจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง

จากค่ามาตรฐานถ้าวัดค่า O.D. ที่ 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1 แสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการวัดค่า O.D. ที่ 260 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 0.080

ค่า O.D. ที่ 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1 มีปริมาณดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ถ้าค่า O.D. ที่ 260 นาโนเมตร เท่ากับ 0.080 จะมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ

0.080 × 50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)/1 = 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำค่าที่ได้ไปคูณค่าการเจือจางจึงจะได้ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

2. ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

ตัวอย่างจะต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม จากการสกัดที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) (คำนวณได้จากการวัดค่า O.D.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณดีเอ็นเอ 150 µg/ml = 150 ✕ 1,000 นาโนกรัมต่อ 1,000 ไมโครลิตร

= 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ดังนั้นมีดีเอ็น 150 นาโนกรัมในปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ต้องปิเปตดีเอ็นเอเท่ากับ

500 (นาโนกรัม) ✕ 1 (ไมโครลิตร)/150 (นาโนกรัม) = 3.33 ไมโครลิตร

การเตรียม Mix dNTPs

ต้องการเตรียม Mix dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จาก stock ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

(1.25 มิลลิโมลาร์)(100 ไมโครลิตร) = (100 มิลลิโมลาร์) V_2

V_2 = 1.25 ไมโครลิตร

ดังนั้นต้องปิเปต stock dNTPs แต่ละเบสมา 1.25 ไมโครลิตร

จะได้ Mix dNTPs จำนวน 5 ไมโครลิตร ซึ่งมาจาก dATP, dCTP, dGTP และ dTTP อย่างละ 1.25 ไมโครลิตร จึงต้องเติมน้ำ 95 ไมโครลิตร จะทำให้ได้ Mix dNTPs เข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

การคำนวณปริมาณ Mix dNTPs ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1 ปฏิกิริยา มีปริมาตรสารรวม 25 ไมโครลิตร และ Mix dNTPs ต้องมีความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ โดยเตรียมจาก Mix dNTPs เข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

(200 ไมโครโมลาร์)(25 ไมโครลิตร) = (1.25 มิลลิโมลาร์) V_2

V_2 = 4 ไมโครลิตร

ดังนั้น จะต้องปิเปต Mix dNTPs เข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ มาจำนวน 4 ไมโครลิตร จะทำให้ได้ working reaction เท่ากับ 200 ไมโครโมลาร์

การเตรียมไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะต้องมีความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร เตรียม 50 ไมโครลิตรจาก stock ที่มีความเข้มข้น 100 พิโคโมล

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

(100 พิโคโมล) V_1 = (20 พิโคโมล) (50 ไมโครลิตร)

V_1 = 10 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น จะต้องปิเปต stock ไพรเมอร์มา 10 ไมโครลิตร และเติมน้ำ 40 ไมโครลิตร จะทำให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 20 พิโครโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE (Tris Boric EDTA)

สารเคมี 1. Tris base ($C_4H_{11}NO_3$) น้ำหนักโมเลกุล 121.14 กรัมต่อโมล

2. Boric acid (H_3BO_3) น้ำหนักโมเลกุล 61.83 กรัมต่อโมล

3. 0.5 โมลาร์ EDTA พีเอช 8.0

4. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม 10 เท่าของบัฟเฟอร์ TBE 1,000 มิลลิลิตร

1. ชั่งสาร Tris base และ Boric acid อย่างละ 108 และ 55 กรัม
2. ตวง 0.5 โมลาร์ EDTA พีเอช 8.0 จำนวน 20 มิลลิลิตร
3. นำสารข้อ 1 และ 2 เทรวมกันคนให้ละลาย จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร
4. นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนการเตรียม 1 เท่าของบัฟเฟอร์ TBE 500 มิลลิลิตรจาก 10 เท่าของบัฟเฟอร์ TBE จาก

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$(1x)(500 \text{ มิลลิลิตร}) = (10x)\ V_2$$

$$V_2 = 50 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้น จะต้องตวง 10 เท่าของบัฟเฟอร์ TBE มา 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร

การเตรียม EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1. ชั่ง EDTA 93.06 กรัม (1 โมลาร์ EDTA เท่ากับ 372.24 กรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) ใส่ลงบีกเกอร์ ละลาย EDTA ในน้ำกลั่นปริมาณ 300 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic bar สารละลายสีขาวขุ่นจะใสขึ้น
2. ปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 8 จากนั้นนำไปปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร
3. นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr, Ethidium bromide)

1. ดูดสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์จาก stock มา 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในถาดย้อมเจล
2. ตวง 1 เท่าของบัฟเฟอร์ TBE 200 มิลลิลิตร ใส่ลงถาดย้อมเจลและผสมให้เข้ากัน

การเตรียม RNase A

1. ชั่งสาร RNase A มา 20 มิลลิกรัมใส่หลอดเซนตริฟิวส์
2. เติมน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร
3. ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เสร็จแล้วปั่นเหวี่ยงสาร

ตารางแสดงตัวอย่างพืชสกุล *Passiflora* จากฐานข้อมูล NCBI ทั้งหมด 12 สายพันธุ์

(Valéria และคณะ, 2003 ; Yockteng และ Nadot , 2004)

รหัสตัวอย่าง	ชื่อสายพันธุ์
EU258438	*P. sidifolia*
EU258372	*P. edmund*
EU258446	*P. tenuifila*
EU258468	*P. villosa*
EU258383	*P. edulis*
AF454800	*P. alata*
DQ238786	*P. xiikzodz*
AY632719	*P. tenuiloba*
DQ521281	*P. biflora*
DQ458082	*P. helleri*
AY648559	*P. murucuja*
EU258465	*P. umifolia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางองค์ประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS (Murashige and Skoog , 1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$NH_4 NO_3$	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.80
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inosital	100
Sucrose	30,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้