



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลคราม

ด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล

STUDY ON GENETICS DIVERSITY AND RELATIONSHIPS OF *INDIGOFERA* L.

BY MOLECULAR MARKER TECHNIQUES

โดย

กมลพร ปานง่อม สุคนธ์ทิพย์ บุญวงศ์ และกุลชญา เกศสุวรรณ



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลคราม
ด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล
STUDY ON GENETICS DIVERSITY AND RELATIONSHIPS OF *INDIGOFERA* L.
BY MOLECULAR MARKER TECHNIQUES

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2552
จำนวน 115,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวกมลพร ปานง่อม
ผู้ร่วมโครงการ นางสาวสุนันท์ทิพย์ บุญวงศ์
นางสาวกุลชญา เกศสุวรรณ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
28 กุมภาพันธ์ 2554

กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้จัดสรรงบประมาณเพื่อสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2552 จนทำให้งานวิจัยนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ขอขอบคุณฝ่ายยุทธศาสตร์และประสานงานวิจัย สำนักวิจัยและสำนักงานวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร ที่ได้ช่วยประสานงานและดูแลในเรื่องการเบิกจ่ายเงินวิจัยในการทำวิจัยแต่ละงวด สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดีตลอดจนเสร็จสิ้นโครงการวิจัย

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่โจ้- แพร์ เจลิมพระเกียรติ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ University of Hawaii at Manoa ที่เชื้อเพื่อสถานที่ ครุภัณฑ์ และวัสดุอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ เพื่อใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอก ณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ University of Hawaii at Manoa ที่ได้สอนและฝึกเทคนิคต่างๆ จนทำให้ผู้วิจัยทำงานวิจัยได้สำเร็จลงด้วยดี

ขอขอบคุณคุณสว ไฉ และคุณบุญธิดา มัฐผา ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดพืชสกุลครามในครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร์ เจลิมพระเกียรติที่ให้ความช่วยเหลือในช่วงของการทำวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวมยุรา วีระนะ นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ช่วยเหลือในการเตรียมสารและอุปกรณ์สำหรับการทำวิจัย ตลอดจนรวบรวมข้อมูลทางฐานวิทย์ของพืชสกุลคราม ซึ่งทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ท้ายที่สุดนี้ดิฉันขอขอบคุณ Professor Dr. Sterling Keeley ณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ University of Hawaii at Manoa ที่ได้ให้คำปรึกษาต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย และให้ความช่วยเหลือต่างๆ ในทุกๆ ด้านตลอดช่วงเวลาที่ทำวิจัย ณ ต่างประเทศ

คณะผู้วิจัย

28 กุมภาพันธ์ 2554

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตของการศึกษา	4
1.5 นิยามศัพท์	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลคราม	5
2.2 ต้นกำเนิดและการกระจายพันธุ์ของพืชสกุลคราม	5
2.3 ประโยชน์ของพืชสกุลคราม	9
2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	14
2.5 จำนวนโครโมโซมของพืชสกุลคราม	15
2.6 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคซีวีวิทยาโมเลกุล	15
2.7 การสร้างสายวิวัฒนาการแบบต้นไม้	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	21
3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุลคราม	21
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม	22
3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS และ Chloroplast	22
3.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree)	27
3.5 ระยะเวลาทำการวิจัยและแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	27
3.6 สถานที่ทำการวิจัย	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง	28
4.1 การรวบรวมสัณฐานวิทยาของพืชสกุลคราม	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม	37
4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับเบสในบริเวณ ITS และคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลคราม	37
4.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน ITS และคลอโรพลาสต์	42
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	48
5.1 สันฐานวิทยาของพืชสกุลคราม	48
5.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม	49
5.3 การเพิ่มปริมาณและการหาลำดับเบสดีเอ็นเอในส่วน ITS และคลอโรพลาสต์	50
5.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน ITS และคลอโรพลาสต์	52
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	54
6.1 สันฐานวิทยาของพืชสกุลคราม	54
6.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม	54
6.3 การเพิ่มปริมาณและการหาลำดับเบสดีเอ็นเอในส่วน ITS และคลอโรพลาสต์	54
6.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน ITS และคลอโรพลาสต์	55
6.5 ข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก	61
การเตรียมสารเคมี	62

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างสารเคมีในใบของครามชนิด <i>I. tinctoria</i> และ <i>I. arrecta</i>	11
ตารางที่ 2.2 แสดงสารเคมีที่พบในครามชนิดต่างๆฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาการ และการทดสอบความเป็นพิษ	12
ตารางที่ 2.3 การใช้ครามสกุลต่างๆเพื่อเป็นยารักษาโรคในชนบทของประเทศไทย	14
ตารางที่ 3.1 จำนวนตัวอย่าง ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง และหมายเลขตัวอย่าง	22
ตารางที่ 3.2 จำนวนและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียส และคลอโรพลาสต์	23
ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์	24
ตารางที่ 3.4 ตารางแผนดำเนินงานวิจัย	27
ตารางที่ 4.1 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่วัดได้จากเครื่องวัดสารพันธุกรรม	37

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของ Indigo	10
ภาพที่ 2.2 แผนที่ตำแหน่งของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของยาสูบ	16
ภาพที่ 2.3 แผนที่ตำแหน่งของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของยาสูบ	17
ภาพที่ 2.4 ภาพแสดงส่วนประกอบของแผนภูมิกิ่งไม้	19
ภาพที่ 2.5 ภาพแสดงลักษณะของ phylogenetic tree A = Unrooted tree B = Rooted tree	19
ภาพที่ 4.1 ลัณฐานวิทยาของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม	34
ภาพที่ 4.2 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของ ITS ที่ได้จากไพรเมอร์ ITS4_ITS5	38
ภาพที่ 4.3 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์ที่ได้จากไพรเมอร์ trnL_rpl132	39
ภาพที่ 4.4 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ psbA_trnH	39
ภาพที่ 4.5 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์ จากไพรเมอร์ rpl16F71-rpl16R1516	40
ภาพที่ 4.6 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ trnLC_trnLF	40
ภาพที่ 4.7 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ trnT ^{GGU} - trnY ^{GUA}	41
ภาพที่ 4.8 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ trnD ^{GUC} - trnE ^{UUC}	41
ภาพที่ 4.9 เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่ได้จาก ลำดับเบสในบริเวณ ITS ของไพรเมอร์ ITS4_ITS5	43
ภาพที่ 4.10 เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่ได้จาก ลำดับเบสในบริเวณคลอโรพลาสต์ ของไพรเมอร์ psbA_trnH	44
ภาพที่ 4.11 เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่ได้จาก ลำดับเบสในบริเวณคลอโรพลาสต์ ของไพรเมอร์ rpl16F71_rpl16R1516	45
ภาพที่ 4.12 เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่ได้จาก ลำดับเบสในบริเวณคลอโรพลาสต์ ของไพรเมอร์ trnL_rpl132	46
ภาพที่ 4.13 เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม ที่ได้จากลำดับเบสในบริเวณส่วน ITS และคลอโรพลาสต์	47

การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลคราม
ด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล

STUDY ON GENETICS DIVERSITY AND RELATIONSHIPS OF
INDIGOFERA L. BY MOLECULAR MARKER TECHNIQUES

กมลพร ปานง่อม¹ สุกนธ์ทิพย์ บุญวงศ์¹ และกุลชญา เกศสุวรรณ²

KAMONPORN PANNGOM¹, SUKHONTHIP BUNWONG¹ and KULCHANA KESSUWAN²

¹ มหาวิทยาลัยแม่โจ้- แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ต. แม่ทราย อ. ร้องกวาง จ. แพร่ 54140

² ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ ต. แม่คำมี อ. เมือง จ. แพร่ 54000

บทคัดย่อ

จากการเก็บรวบรวมข้อมูลฐานวิธานจากรายงานการวิจัยของ สว. มัธฐา (2550) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลครามจำนวน 8 ชนิด 9 ตัวอย่าง *I. lacei*, *I. caloneura*, *I. sootepensis*, *I. emmae*, *I. dosua*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, และ *I. hirsuta* พบว่าพืชสกุลครามมีฐานวิธานเป็นไม้พุ่มสูงและเป็นไม้ทอดเลื้อย มีใบประกอบเรียงแบบสลับ ใบย่อยมี 5-11 ใบ มีหูใบรูปสามเหลี่ยมถึงสามเหลี่ยมแคบ กลีบเลี้ยงมีหลอดกลีบรูปถ้วย กลีบดอกมีสีชมพูเข้มหรือสีขาว และเมื่อนำใบอ่อนแห้งมาสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Dneasy Plant Mini Kits และตรวจสอบผลด้วยเครื่องวัดสารพันธุกรรมปริมาณน้อย (Spectrophotometer Nanodrop) ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอมีค่าความบริสุทธิ์อยู่ระหว่าง 1.75-1.87 และมีปริมาณของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 24.28 – 84.74 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับเบสในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ trnS^{UGA} - trnF^{CAU} และ rpS16F2 - trnK^{UUU} ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ได้ แต่ไพรเมอร์ ITS4_ITS5, trnLC _trnLF, rpL16F71 _rpL16R1516, psbA _trnH, trnD^{GUC} _trnE^{UUC}, trnT^{GGU} _trnY^{GUA} และ trnL _rpL132 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามจากลำดับเบสในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ ITS4_ITS5, rpL16F71 _rpL16R1516, psbA _trnH, และ trnL -rpL132 เดนโดแกรมสามารถออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. spicata* (Hawaii1) และ *I. spicata* (Hawaii 2) และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* และ *I. hirsuta*

ABSTRACT

The collection of morphological data of genus *Indigofera* L. from Sawai Mattpha (2550) which eight species and nine samples namely; *I. lacei*, *I. caloneura*, *I. sootepensis*, *I. emmae*, *I. dosua*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei* and *I. hirsuta* were founded in northern part of Thailand. The morphology of the genus were perennial shrubs and scandent, alternate compound leaves, 5-11 leaflets, triangular stipules, cup-shaped calyx. Flower inflorescences with purplish and whitish. The dried leaves were extracted by Dneasy Plant Mini Kits and measured by Spectrophotometer Nanodrop. The results showed that the DNA was purify (OD_{260}/OD_{280}) between 1.75 and 1.87 and the amount of DNA is between 24.28 and 84.74 ng /ml. One primer was used to amplify internal transcribed spacer region (ITS) and eight primers were used to generate chloroplast DNA of genus *Indigofera* and *Clitoria* sp. (outgroup). Two primers; trnS^{UGA}_trnM^{CAU} and rps162F2_trnK^{UUU} do not use to amplify chloroplast DNA and seven primers; ITS4 ITS5, trnLC_trnLF, rpl16F71_rpl16R1516, psbA_trnH, trnD^{GUC}_trnE^{UUC}, trn^{TGGU}_trnY^{GUA} and trnL_rpl132 can increase the amount of ITS and chloroplast DNA of the genus. Genetic relationships of the genus were investigated by ITS and chloroplast DNA sequences from 4 primers; ITS4-ITS5, rpl16F71_rpl16R1516, psbA_trnH, and trnL_rpl132 can classify plant into 3 groups. Group I comprise of only one specie; *Clitoria* sp. Group II consists of 4 species; *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. spicata* (Hawaii1) and *I. spicata* (Hawaii 2) and Group III consists of 6 species; *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* and *I. hirsuta*.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของปัญหา

ครามจัดเป็นพืชในสกุล *Indigofera* L. วงศ์ (Family) Fabaceae มีการกระจายพันธุ์โดยทั่วไปในบริเวณเขตร้อนและเขตอบอุ่น จากการสำรวจพบว่าทั่วโลกนั้นมีประมาณ 720-740 ชนิด และในแต่ละพื้นที่ที่พบก็มีความหลากหลายทางชนิดที่แตกต่างกัน (Nwachukwu and Edeoga, 2006, Choi and Kim, 1997) สำหรับประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ (2544) รายงานว่ามีจำนวนทั้งหมด 16 ชนิด แต่ละชนิดมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น คราม ครามดอย ครามป่า ครามหลวง แหล่งที่พบนี้นั้นกระจายอยู่ทั่วไปในแต่ละภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือเป็นพื้นที่ที่มีการรายงานว่ามีความหลากหลายทางชนิดของพืชสกุลครามมากที่สุด ซึ่งพบทั้งหมดจำนวน 15 ชนิด คือคราม (*Indigofera tinctoria* L.) ครามดอย (*I. cassioides* Rottl. ex DC.) ครามป่า (*I. caloneura* Kurz) ครามเช้า (*I. caudate* Dunn) ถั่วดิน (*I. dosau* Buch-Ham) ชะคราม (*I. galegoides* DC.) ครามเครือ (*I. hendecaphylla* Jacq.) ครามขน (*I. hirsuta* L.) ครามกลิ้ง (*I. kasinii* Boonyamalik) ครามหมอเคอร์ (*I. kerrii* De Kort & Thijssse) ครามเขา (*I. lacei* Craib) ครามป่า (*I. sootepensis* Craib) ป่าหิ้งเม่น (*I. squalida* Prain) และครามหลวง (*I. zollingeriana* Miq.) ส่วนชนิดสุดท้ายคือ ลูกพรวน (*I. trifoliata* L.) พบเฉพาะในเขตภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทยเท่านั้น โดยครามแต่ละชนิดที่พบนี้นั้นจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันไป โดยบางชนิด เช่น *I. tinctoria* เป็นชนิดที่ให้สารสีน้ำเงินหรือสีอินดิโก (indigo) ที่คล้ายกันกับพืชสกุลฮ้อม (*Strobilanthes* L.) ที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ภูมิปัญญาท้องถิ่นของประชาชนในเขตภาคอีสานและภาคเหนือจึงนิยมนำมาใช้ในการย้อมผ้า เช่น ผ้าหม้อฮ้อมของชาวตำบล พุงไธสง อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ แทนสีอินดิโกที่ได้จากต้นฮ้อม เนื่องจากปัจจุบันนี้ต้นฮ้อมที่พบในเขตจังหวัดแพร่และจังหวัดใกล้เคียงนั้นมีจำนวนลดน้อยลง ส่วนสารสกัดจากใบและรากของครามบางชนิดยังมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาอีกด้วย เช่น *I. hirsuta* L. พบสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ในการรักษาการเป็นแผลในกระเพาะอาหาร และอาการท้องเสียได้ ส่วนชนิด *I. tinctoria* สารสกัดจากใบที่ได้จะช่วยในกลไกการซ่อมแซมของระบบประสาท และสารจากรากช่วยรักษาอาการตับอักเสบและระบบขับถ่าย (Siva, 2007) นอกจากนี้ยังพบสารประเภท furano-flavonoid ในครามชนิด *I. tinctoria* L. มีฤทธิ์ในการลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดและโรคหัวใจ (Narender et al., 2006)

จากรายงานการศึกษาสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ จำนวนโครโมโซม และสัณฐานวิทยาของละอองเกสร พบว่ายังไม่สามารถจำแนกและระบุชนิดของพืชสกุลครามได้ชัดเจนเท่าใดนัก สาเหตุเกิดจากว่าสัณฐานวิทยาของพืชสกุลครามแต่ละชนิดมีความแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของพืชสกุลนี้ และจำนวนโครโมโซมที่พบในพืชสกุลครามบางชนิดนั้นมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน และภายในกลุ่มของพืชสกุลครามยังมีบางชนิดที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (Diploid) และบางชนิดมีจำนวนโครโมโซมเป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) โดยมีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ $2n=2x=16$ ไปจนถึง $2n=2x=48$ (Choi and Kim, 1997) ส่วนสัณฐานวิทยาของละอองเกสร (pollen gain morphology) ของพืชสกุลครามนั้นยังมีหลายชนิดที่มีลักษณะของสัณฐานวิทยาของละอองเกสรที่เหมือนกัน (Nwachukwu and Edeoga, 2006) ปัจจุบันนี้การประยุกต์ข้อมูลจากการศึกษาทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชนั้นเป็นที่นิยมมากขึ้น เนื่องจากว่าข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอนั้นให้ความถูกต้อง แม่นยำ และสามารถระบุชนิดหรือสายพันธุ์ พร้อมบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชได้อย่างชัดเจน (Archak, 2000) มากกว่าการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ จำนวนโครโมโซม และสัณฐานวิทยาของละอองเกสร โดย Choi and Kim (1997) วิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน of internal transcribed spacer (ITS) และ 5.8s ribosomal RNA (rRNA) เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและระบุชนิดของพืชสกุลคราม พบว่าข้อมูลที่ได้สามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลครามที่มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ $2n=2x=16$ ซึ่งเป็นพืชดิพลอยด์กับพืชสกุลครามที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นโพลีพลอยด์ ($2n=2x=48$) ได้ นอกจากนี้ในปัจจุบันการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสายวิวัฒนาการของพืชนิยมใช้ดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่ลำดับเบสมีความผันแปรไปในแต่ละชนิดของพืช ทำให้นำมาใช้ในการบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสายวิวัฒนาการของพืชได้

เนื่องจากประโยชน์ที่หลากหลายของพืชสกุลครามดังที่กล่าวมาประกอบกับปัญหาในการจัดจำแนกชนิดของพืชสกุลครามนั้นทำได้ยาก เนื่องจากเป็นพืชในสกุลที่มีจำนวนชนิดมาก และยังไม่มียข้อมูลพันธุกรรมของพืชสกุลครามชนิดต่างๆ ในระดับดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ชนิด ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของพืชสกุลคราม และเพื่อให้สอดคล้องกับแผนนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ. 2551-2553) ในเรื่องของการจัดการสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อเชื่อมต่อภูมิปัญญาของชาวบ้าน และเกิดองค์ความรู้ใหม่ในการนำความหลากหลายทางชีวภาพมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการพัฒนาคุณภาพชีวิตของประชาชน ดังนั้นกลุ่มนักวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับข้อมูลทาง

พันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของครามแต่ละชนิดที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทยว่ามีความหลากหลายทางชนิด และมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอเป็นอย่างไร โดยการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular Biology) วิเคราะห์พันธุกรรมของพืชสกุลคราม ที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย เพื่อใช้ในการจัดจำแนก และบ่งชี้ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลคราม และใช้ประกอบเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การวิจัยขั้นสูงทางด้านต่างๆ เช่น ศึกษาสารเคมีต่างๆ หลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางยาที่ใช้ในทางการแพทย์ และสารเคมีสีน้ำเงินที่ใช้ในการย้อมผ้า เป็นต้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยการใช้เทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

1.2.2 เพื่อจัดจำแนกและระบุชนิดของพืชสกุลครามให้มีความถูกต้องโดยการใช้ลำดับเบสในส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ใน ITS และคลอโรพลาสต์ จากเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

1.2.3 เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลครามที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทยโดยการนำแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาสร้างเดนไดรแกรม

1.2.4 เพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพืชสกุลคราม เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทำให้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่พบในเขตภาคเหนือบางจังหวัดของประเทศไทย

1.3.2 สามารถจัดจำแนกและระบุชนิดของพืชสกุลครามจากการใช้ข้อมูลดีเอ็นเอ

1.3.3 ทราบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลครามแต่ละชนิดที่พบในเขตภาคเหนือบางจังหวัดของประเทศไทย

1.3.4 เกิดองค์ความรู้ใหม่ทางด้านพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพืชสกุลคราม และสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ดังกล่าวไปใช้ร่วมกับภูมิปัญญาชาวบ้านในการศึกษาคุณสมบัติขององค์ประกอบทางเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านต่างๆ ของพืชสกุลครามต่อไป

1.3.5 สามารถนำผลงานการวิจัยตีพิมพ์และเผยแพร่ในการประชุมวิชาการหรือวารสารระดับชาติหรือนานาชาติ

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

สำรวจและเก็บรวบรวมพืชสกุลครามชนิดต่างๆ ในพื้นที่บางจังหวัดในเขตภาคเหนือของประเทศไทย และนำมาปลูกในเรือนเพาะชำของมหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ดีเอ็นเอของพืชสกุลฮ่อมด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล ณ University of Hawaii at Manoa และนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการระบุความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรม พร้อมบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลฮ่อม

1.5 นิยามคำศัพท์

1.5.1 อนุกรมวิธานพืช (Plant Taxonomy) คือการศึกษาเกี่ยวกับพืชทางด้านการจัดจำแนกออกเป็นหมวดหมู่ (Classification) การตรวจสอบเอกลักษณ์ ลักษณะ และการวินิจฉัยชื่อ (Identification) และการกำหนดหรือการตั้งชื่อ (Nomenclature)

1.5.2 สัณฐานวิทยาของพืช (Plant Morphology) คือการศึกษาเกี่ยวกับรูปร่าง ลักษณะ และโครงสร้างภายนอกของพืช

1.5.3 คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (Chloroplast DNA) คือ ดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสต์เป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่ถูกถ่ายทอดจากแม่ (maternal inheritant)

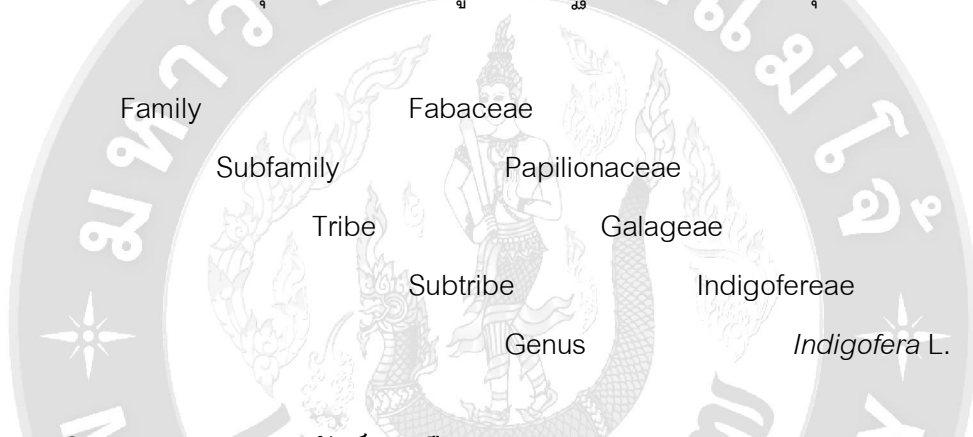
1.5.4 Internal transcribed spacer region (ITS) คือบริเวณลำดับเบสที่เรียกว่า non-coding sequence โดยมีอยู่ 2 ชนิด คือ ITS1 ตั้งอยู่ระหว่างยีน 18S และ 5.8S และ ITS2 ตั้งอยู่ระหว่าง 5.8S และ large subunit ซึ่งเป็นลำดับเบสที่สามารถนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของพืชได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลคราม

พืชสกุลคราม เป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อยและเกาะตามสิ่งที่อยู่ใกล้เพื่อทอดลำต้น ลำต้นมีสีเขียวหรือสีแดงอ่อน ใบเป็นใบประกอบขนนก ขนาดเล็ก ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร และบริเวณผิวใบมีขนเป็นรูปอักษรตัวที ดอกมีขนาดเล็กคล้ายดอกถั่ว มีสีม่วง สีแดงหรือชมพู การออกดอกจะออกเป็นช่อตั้ง ฝักมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกคล้ายฝักถั่วแต่เล็กกว่า ขนาดความยาวของฝัก 5-8 เซนติเมตรมีสีแดงหรือสีน้ำตาล เมล็ดสีครีมอมเหลือง หนึ่งฝักจะมีเมล็ดประมาณ 2-15 เมล็ด (Choi and Kim, 1997) ลำดับของการจัดจำแนกพืชสกุลครามโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาตามหลักอนุกรมวิธาน เป็นดังนี้



2.2 ต้นกำเนิดและการกระจายพันธุ์ของพืชสกุลคราม

พืชสกุลคราม (*Indigofera* L.) มีต้นกำเนิดในแอฟริกา จีน อินเดีย และออสเตรเลีย ถูกนำเข้าไปในชวาเมื่อปี 1923 เพื่อปลูกเป็นพืชคลุมดินตามเชิงเขาในไร่ชา ยาง และปาล์มน้ำมัน ขยายเข้าไปในฟิลิปปินส์ในปี 1927 เพื่อปลูกให้สูงประมาณ 35 เซนติเมตร แล้วตัดเป็นหญ้าแห้งร่วมกับหญ้าอื่นๆที่ขึ้นปนกันใช้เป็นอาหารสัตว์ การที่ครามเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วทำให้ จาไมกานาครามไปปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อกำจัดวัชพืช และตัดครามเป็นปุ๋ยพืชสด การกระจายพันธุ์ของพืชสกุลครามพบได้ทั่วไปในแถบเขตร้อนและเขตอบอุ่นของโลก สำหรับประเทศไทยพบกระจายอยู่ทั่วประเทศ แต่พบความหลากหลายทางชนิดมากที่สุดบริเวณเขตภาคอีสานและภาคเหนือของประเทศ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการกระจายพันธุ์

2.2.1 การศึกษาพืชสกุลครามในทวีปเอเชีย

De Candolle (1825) อ้างจาก สไว มัฐฐวา (2550) ได้แบ่งสกุลครามออกเป็น 5 หมู่ (Section) ได้แก่ Brachypodae, Digitatae, Multijugae, Oilgopyhyllae และ Simplicifoliae

Yun-Yi and Chao-Zong (1983) อ้างจาก สไว มัฐผา (2550) ศึกษาพืชสกุลคราม ในประเทศจีนแบ่งพืชเป็น 3 สกุลย่อย 14 หมู่ย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Acanthonotus*, *Indigofera* และ *Shaeriodiophora*

Baker (1879) อ้างจาก สไว (2550) ศึกษาพืชวงศ์ถั่วในประเทศอินเดีย พบพืชสกุลคราม 40 แทกซา เป็นพืชที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย 18 แทกซา ได้แก่ *Indigofera atropurpurea* Buch.-Ham. ex Horn., *I. caloneura* Kurz, *I. cylindracea* Wall., *I. dosua* Hamilt. var. *tomentosa* sensu Hamilt. (*I. dosua*), *I. echinata* Willd. (*I. numulariifolia* sensu (L.) Liver ex Alston), *I. endecaphylla* Jacq. (*I. hendecaphylla* Jacq. Var. *hendecaphylla* Jacq.), *I. enneaphylla* sensu L. (*I. glabra* L.), *I. pulchella* sensu Roxb. (*I. cassioides* Rottler ex DC.), *I. subulata* Vahl ex Poiret, *I. tinctoria* L., *I. triata* L.f., *I. trifoliata* L., *I. viscosa* Lamk. (*I. colutea* sensu (Burm.f.) Merr.) และ *I. wightii* Grah.

Craib (1913) อ้างจาก สไว มัฐผา (2550) ศึกษาพืชสกุลครามในประเทศจีน พบ 56 ชนิด เป็นพืชที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย 12 ชนิด ได้แก่ *Indigofera atropurpurea*, *I. caudate*, *I. cineracens* sensu Franch. (*I. wightii*), *I. elliptica* sensu Roxb. (*I. cassioides*), *I. galegoidea*, *I. hirsuta*, *I. linifolia*, *I. reticulate*, *I. scabrida*, *I. teysmannii*, *I. stachyodes* sensu Lindl. (*I. dosua*) และ *I. trifoliata*

Ali (1958) อ้างจาก สไว (2550) ศึกษาทบพวนพืชสกุลครามในประเทศปากีสถาน แถบตะวันตกและแถบหิมาลัย พบ 31 แทกซา เป็นพืชที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย 13 แทกซา ได้แก่ *Indigofera atropurpurea*, *I. cassioides*, *I. colutea*, *I. cylindracea*, *I. dosua*, *I. glabra*, *I. hamiltonii* Grah. Ex Duthie & Prain (*I. atropurpurea*), *I. hirsuta*, *I. linifolia*, *I. linnaei*, *I. subulata* sensu Vahl ex Poiret var. *microphylla* (*I. trita* L.f. subsp. *Subulata* (Vahl ex Poiret) Sli var. *scabra* (Roth) Ali), *I. subulata* sensu Vahl ex Poiret var. *nubica* (*I. trita* subsp. *Subulata* var. *scabra*) และ *I. tinctoria*

Huang and Ohashi (1993) อ้างจาก สไว (2550) ศึกษาพืชในประเทศไต้หวัน พบพืชสกุลคราม 8 ชนิดเป็นพืชที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย 6 ชนิด ได้แก่ *Indigofera galegoidea*, *I. hirsuta*, *I. linifolia*, *I. nigrescens* Kurz, *I. spicata* Forssk., *I. suffruticosa* Mill., *I. trifoliata* และ *I. zollingeriana* Miq.

2.2.2 การศึกษาพืชสกุลครามในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Lecomte (1916) อ้างจาก สไว มัธฐา (2550) ศึกษาพืชวงศ์ถั่วในเขตอินโดจีนพบพืชสกุลคราม 23 แรกชา ได้แก่ *Indigofera anil* L., *I. aralensis* Gagnep., *I. bufalina* Lour., *I. dosua*, *I. endecaphylla* Jacq. var. *siamensis*, *I. enneaphylla*, *I. galegoides*, *I. hirsuta*, *I. laotica* Gagnep., *I. laxiflora* Craib, *I. tinifolia*, *I. nigrescens*, *I. oblonga* Craib, *I. pentaphylla* L., *I. polygaloides* Gagnep., *I. pulchella*, *I. sootepensis* Craib, *I. squalida* Prain, *I. tinctoria*, *I. teysmannii* Miq., *I. trifoliata* และ *I. wightii*

Merrill (1923) อ้างจาก สไว มัธฐา (2550) รวบรวมรายชื่อพันธุ์ไม้ในประเทศฟิลิปปินส์พบสกุลคราม 10 แรกชา ได้แก่ *Indigofera galegoides*, *I. hendecaphylla* Jacq., *I. hirsuta*, *I. linifolia*, *I. nigrescens*, *I. suffruticosa*, *I. tinctoria*, *I. trifoliata*, *I. unifoliolata* Merr. และ *I. zollingeriana*

Backer and Bakhuizen (1965) อ้างจาก สไว มัธฐา (2550) ศึกษาพืชในเกาะชาวประเทศอินโดนีเซีย พบพืชสกุลคราม 18 แรกชา ได้แก่ *Indigofera arrecta* Hochet. ex A. Rich., *I. colutea*, *I. cordifolia*, *I. galegoides*, *I. glandulosa*, *I. guatemalensis* Moc., *I. hirsuta*, *I. linifolia*, *I. linnaei*, *I. longeracemosa* Beiv. ex Baill., *I. nigrescens*, *I. oblongifolia*, *I. tinctoria*, *I. trifoliata*, *I. trita*, *I. spicata*, *I. suffruticosa* และ *I. zollingeriana*

De Kort and Thijssse (1984) อ้างจาก สไว มัธฐา (2550) ศึกษาทบทวนพืชสกุลครามในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบ 44 แรกชา ได้แก่ *Indigofera aralensis*, *I. arrecta*, *I. atropurpurea*, *I. bella* Prain, *I. brunoniana*, *I. caloneura*, *I. cassioides*, *I. caudata* Dunn., *I. colutea*, *I. cordifolia*, *I. decora* Lindl., *I. dosua*, *I. galegoides*, *I. glabra* L., *I. glandulosa*, *I. hirsuta*, *I. kerrii* de Kort & Thijssse, *I. lacei* Craib, *I. laxiflora*, *I. linifolia*, *I. linnaei*, *I. luzonensis* de Kort & Thijssse, *I. minbuensis* Gagnep, *I. nigrescens*, *I. nummulariifolia* (L.) Liver ex Alaston, *I. oblongifolia*, *I. parkesii* Craib *I. reticulata* Franch., *I. emmae* de Kort & Thijssse, *I. sootepensis* subsp. *sootepensis*, *I. sootepensis* subsp. *acutifolia* de Kort & Thijssse, *I. spicata* var. *spicata* var. *siamensis* (Hoss.) de Kort & Thijssse, *I. squalida*, *I. suffruticosa* subsp. *guatemalensis* (Moc., Sesse & Cerv. Ex Backer) de Kort & Thijssse, *I. suffruticosa* subsp. *suffruticosa*, *I. tinctoria*, *I. trifoliata* subsp. *scabra* (Roth) de Kort & Thijssse, *I. trita* subsp. *subulata* (Vahl ex Poir.) Ali, *I. wightii*, *I. zollingeriana* และ *I. sp.*

Sanjappa (1985) อ้างจาก สไว มัฐผา (2550) ศึกษาพืชสกุลครามในประเทศไทย พบพืชสกุลคราม 26 ชนิด ได้แก่ *Indigofera astragalina* DC., *I. bella*, *I. brunoniana*, *I. caloneura*, *I. cassioides*, *I. colutea*, *I. dosua*, *I. galegoides*, *I. glabra*, *I. linifolia*, *I. maymyensis* Sanjappa, *I. meghalayensis* Sanjappa, *I. minbuensis*, *I. nigrescens*, *I. scabrida* Dunn, *I. spicata*, *I. squalida*, *I. stachyodes*, *I. suffruticosa*, *I. tinctoria*, *I. trifoliata*, *I. trita*, *I. wightii* และ *I. sp.*

Thuan, Phon and Niyomdham (1987) อ้างจาก สไว มัฐผา (2550) ศึกษาพบพรรณพืชวงศ์ถั่วในเขตประเทศอินโดจีน พบ 25 แทกซา ได้แก่ *Indigofera aralensis*, *I. arrecta*, *I. banii* Nguyen Dang Khoi & Yalovlev, *I. caloneura*, *I. cassioides*, *I. caudate*, *I. colutea*, *I. dosua*, *I. galegoides*, *I. glabra*, *I. hirsuta*, *I. linifolia*, *I. linnaei*, *I. longicauda* Thuan, *I. nigrescens*, *I. nummulariifolia*, *I. sootepensis*, *I. spicata*, *I. squalida*, *I. suffruticosa*, *I. tinctoria*, *I. trifoliata*, *I. trita* subsp. *subulata*, *I. wightii* และ *I. zollingeriana*

2.2.3 การศึกษาการกระจายพันธุ์ของพืชสกุลครามในประเทศไทย

พืชสกุลครามได้มีการกระจายพันธุ์เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่ง สไว มัฐผา (2550) ได้รายงานความหลากหลายชนิดของพืชสกุลครามในประเทศไทยแบ่งตามเขตพรรณพฤกษชาติของประเทศไทย (Flora of Thailand) พบว่าภาคเหนือมีความหลากหลายของพืชสกุลครามมากที่สุด โดยพบ 25 ชนิด 1 ชนิดย่อย และ 3 พันธุ์ รองลงมาคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบ 21 ชนิด 1 ชนิดย่อย และ 2 พันธุ์ ภาคตะวันตกเฉียงใต้ พบ 14 ชนิด 1 ชนิดย่อย และ 2 พันธุ์ ภาคตะวันออก พบ 12 ชนิด และ 1 พันธุ์ ภาคกลางพบ 9 ชนิด 1 ชนิดย่อย และ 1 พันธุ์ ภาคใต้พบ 5 ชนิด และภาคตะวันออกเฉียงใต้ พบ 4 ชนิด ตามลำดับ มีพืชที่พบเฉพาะภาคเหนือ 7 ชนิด 1 พันธุ์ ได้แก่ *I. atropurpurea*, *I. caudata*, *I. colutea*, *I. emae*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. scabrida* และ *I. thailandica* มีพืชที่พบเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 ชนิด ได้แก่ *I. arrecta* และ *I. sp.2* และ *I. sp.3* มีพืชที่พบเฉพาะภาคตะวันออก 1 ชนิด คือ *I. sp.1* มีพืชที่พบเฉพาะภาคตะวันตกเฉียงใต้ 1 ชนิด คือ *I. glabra* มีพืชที่พบเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงใต้ 1 ชนิด คือ *I. nummulariifolia* พืชที่พบทุกภาคของประเทศไทย จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *I. galegoides* และ *I. hirsuta*

จรัล ลีรติวงศ์ (2542) ได้ทำศึกษาพืชวงศ์ย่อยประดู่ในเขตอุทยานแห่งชาติภูพาน จังหวัดสกลนครพบพืชสกุลคราม 6 ชนิด ได้แก่ *Indigofera cassioides*, *I. galegoides*, *I. sootepensis*, *I. spicata*, *I. aqualida* และ *I. sp.*

สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ (2544) ได้รวบรวมรายชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ มีพืชสกุลคราม 16 แพกซา ได้แก่ *Indigofera caloneura*, *I. cassioides*, *I. caudate*, *I. dosua*, *I. galegoides*, *I. hendecaphylla*, *I. hirsuta*, *I. kasinii* sensu Boonyamalik (*I. lacei*), *I. kerrii*, *I. lacei*, *I. sootepensis*, *I. squalida*, *I. suffruticosa*, *I. tinctoria*, *I. trifoliata* และ *I. zollingeriana*

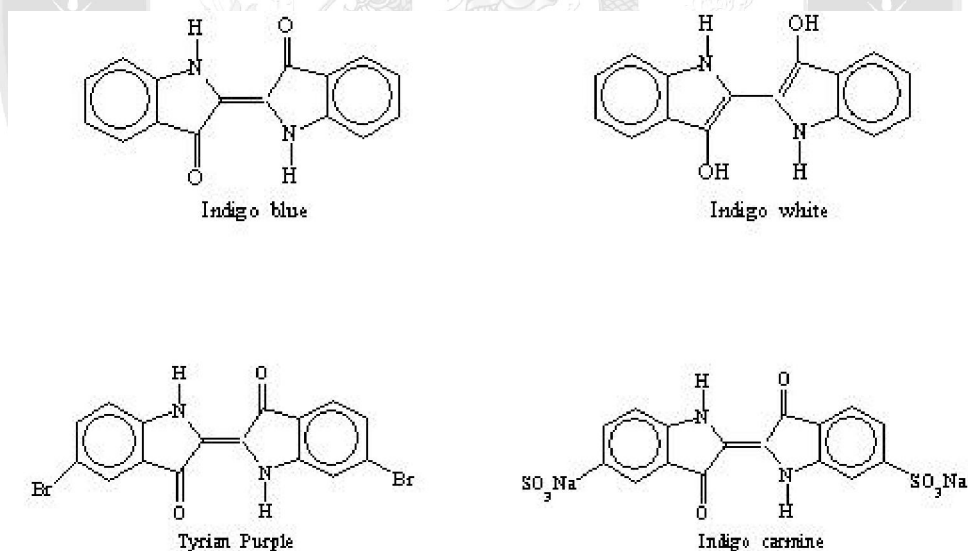
Craib (1928) ได้ศึกษาพืชวงศ์ถั่วในประเทศไทย พบพืชสกุลคราม 22 ชนิด ได้แก่ *Indigofera changensis*, *I. cylindracea*, *I. elliptica*, *I. enneaphylla*, *I. hencecaphylla*, *I. hirsuta*, *I. lacei*, *I. laxiflora*, *I. linifolia*, *I. oblonga*, *I. pallida*, *I. pulchella*, *I. reticulate*, *I. siamensis*, *I. sootepensis*, *I. squalida*, *I. stachyodes*, *I. suffruticosa*, *I. tinctoria*, *I. trifoliata*, *I. uncinata* และ *I. zollingeriana*

2.3 ประโยชน์ของพืชสกุลคราม

2.3.1 การใช้พืชสกุลครามทำสีย้อมผ้า

ชาวบ้านจะใช้ส่วนของใบและลำต้นนำมาทุบและหมักในน้ำประมาณ 5-7 วัน จะได้สีน้ำเงินหรือกรมท่า แล้วนำมาใช้ในการย้อมผ้า ทำคราม และย้อมเสื้อหม้อฮ่อม โดยสีน้ำเงินสดใสของสีครามเป็นหนึ่งในบรรดาสีเก่าแก่ของโลก มีอดีตนานร่วม 6,000 ปี ถือกันว่าเป็นราชาแห่งสีย้อมหรือ "The King of Dye" เป็นที่รู้จักกันตั้งแต่วัฒนธรรมโบราณในเมโสโปเตเมีย อียิปต์ กรีซ โรม แอฟริกา และเอเชีย ทว่าต้นกำเนิดของสีครามนั้นอยู่ในอินเดีย สังเกตได้จากคำว่า Indigo ซึ่งแปลว่าสีคราม สีครามธรรมชาติถูกสกัดจากใบครามสดในรูปของสารต้นตอ (Precursor) หลังจากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอีกหลายครั้งจึงเกิดเป็นสีครามเกาะจับเสื้อผ้า สารต้นตอในใบครามคือสารอินดิแคน (indicacn หรือ indoxyl-B-D-glucoside) เป็นสารไม่มีสีและไม่ละลายน้ำแต่เมื่อถูกแช่ในน้ำ เอนไซม์ชนิดหนึ่งในใบคราม คือ บีตา-กลูโคซิเดส (B-glucosidase) จะช่วยทำให้อินดิแคนแตกออกเป็นสองส่วน คือ อินดอกซิล (indox) และกลูโคส สาร 2 ชนิดนี้เป็นสารไม่มีสีละลายน้ำได้ทั้งคู่จึงละลายในน้ำครามซึ่งมีพีเอชเท่ากับน้ำที่ใช้แช่ใบ รายงานครั้งแรกของการใช้สีครามในจีนมีอายุมากกว่า 6,000 ปี เรื่องราวของการทอผ้าและการใช้ผ้าย้อมครามมีปรากฏในคัมภีร์พระเวทซึ่งมีอายุมากกว่า 4,000 ปี นอกจากนี้มีหลักฐานว่าในราชสำนักของกรีกและโรมันโบราณใช้ผ้าย้อมครามสีม่วงและสีคราม ในศตวรรษที่ 16 อินเดียส่งสีครามธรรมชาติที่สกัดจาก *Indigofera tinctoria* Linn เป็นสินค้าออกให้กับยุโรปทำให้เกิดปัญหาขัดแย้งทางการค้ากับประเทศเยอรมัน ฝรั่งเศส และอังกฤษซึ่งผลิตสีน้ำเงินจากต้น woad (*Isatis tinctoria*) แต่ในที่สุดสีครามได้รับการยอมรับมากกว่าสีจาก woad สีครามสกัดได้จากใบของพืชหลายชนิด แต่ทำให้สีบริสุทธิ์ได้ยาก เมื่อนำไปย้อมผ้าทำ

ให้ได้สี (Shade) ไม่คงที่ จึงยากต่อการผลิตผ้าย้อมครามในระดับอุตสาหกรรม ในที่สุดมนุษย์ก็สังเคราะห์สีครามได้สีครามที่ใช้อยู่ทั่วไปจึงมีทั้งสีครามสังเคราะห์และสีครามธรรมชาติ สีครามมีชื่อเคมี 2-(1,3- Dihydro-3-oxo-2H-indol-2-ylid-ene)-1,2-dihydro-3H-indol-3-one ชื่อทั่วไป Indigo blue หรือ Indigotin เป็นผลึกรูปเข็มสีม่วงหรือสีน้ำเงินระเหิดที่ 107 องศาเซลเซียส มีสมบัติไม่ละลายในน้ำ แอลกอฮอล์ อีเทอร์ และกรดเจือจางแต่ละลายได้ดีมากในสารละลายอะนิลีน และพีรีดีนขณะเดือด ละลายได้ดีพอควรในกรด แอซิติก แคลเซียมคลอไรด์ต้มเดือด ถ้าละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้วจะปรากฏสีม่วงแดง แต่ถ้าละลายในตัวทำละลายมีขั้วจะปรากฏสีน้ำเงิน ถ้าให้ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเย็นจะเกิดกรด Disulphoinc ซึ่งทำให้อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมได้ง่าย เรียกว่า Indigo carmine มีสีน้ำเงินเข้มใช้ย้อมติดสีดีจัดเป็นสีแอซิก (Acid dye) มีกระบวนการย้อมต่างจากการย้อมครามซึ่งเป็นสีแวต Indigo blue ถูกรีดิวซ์ในสารละลายต่างกลายเป็นสารไม่มีสีเรียกว่า Indigo white ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ตัวยูวีและต่างมีหลายคู่ ได้แก่ ไฮโดรซัลไฟต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผุนผงสังกะสีในน้ำปูนใสอุ่นไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส หรือน้ำซี้เก้ในน้ำปูนใส ส่วน Indigo white ถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายมากด้วยออกซิเจนในอากาศกลับไปเป็น Indigo blue



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของ Indigo

ที่มา: <http://pineapple-eyes.snru.ac.th/cram/?q=node/82,2552>

2.3.2 การใช้พืชสกุลครามเป็นยารักษาโรค

สารสกัดจากใบและรากของพืชสกุลครามบางชนิดยังมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาอีกด้วย โดย Siva (2007) รายงานว่าสารสกัดจากใบของ *I. hirsuta* มีฤทธิ์ในการรักษาอาการเป็นแผลในกระเพาะ และอาการท้องเสีย ส่วนสารสกัดจากใบและรากของ *I. tinctoria* จะช่วยในกลไกการซ่อมแซมของระบบประสาท และสารจากรากช่วยรักษาอาการตับอักเสบและระบบขับถ่าย Narender et al. (2006) สารสกัดประเภท furano-flavonoid ในครามชนิด *I. tinctoria* ซึ่งมีฤทธิ์ทาง การแพทย์ คือช่วยในการลดการอุดตันของไขมันในเส้นเลือดที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดและโรคหัวใจได้ Hoessel et al. (1999) ระบุว่าสารชนิด indirubin ที่พบในครามชนิด *I. tinctoria* และ *I. suffruticosa* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclin-dependent kinases ได้ เพื่อนำไปใช้ในการผลิตยาในการรักษาโรคลิวคีเมียในมนุษย์

ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างสารเคมีในใบของครามชนิด *I. tinctoria* และ *I. arrecta*

สารเคมี	ร้อยละจากน้ำหนักใบครามแห้ง	
	<i>I. tinctoria</i>	<i>I. arrecta</i>
ไนโตรเจน	5.11	4.46
ไดฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์	0.78	0.02
โพแทสเซียมออกไซด์	1.68	1.95
แคลเซียมออกไซด์	5.35	4.48

ตารางที่ 2.2 แสดงสารเคมีที่พบในครามชนิดต่างๆฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบความเป็นพิษ

ชนิดของคราม	สารเคมี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	การทดสอบความเป็นพิษ
<i>I. tinctoria</i> Linn.	Degueline; dehydro galactomannan; narinkin; quercetin; rotenone; rutin; sorbose; stachyose; sumatrol; tephrosin	ยับยั้งความเป็นพิษต่อตับ ขับน้ำดี แก้อท้องเสีย ยับยั้ง พยาธิไส้เดือน กระตุ้นเม็ด เลือดขาว ยับยั้งเนื้องอก	สารสกัดส่วนเหนือดิน ด้วยเอทานอล 95%หรือ เอทานอล:น้ำ(1:1) ฉีด เข้าช่องท้องในหนูถีบจักร มีค่าขนาดที่ทำให้ สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง มากกว่า1ก/กก การให้หนู ถีบจักรกินในขนาด 6 ก/ กก เป็นเวลา 7วัน ไม่พบ ความเป็นพิษ
<i>I. hirsuta</i> Linn.	Alanine; alanine, phenyl : arginine; aspartic acid canavanine; glutamic acid; glycine; goosypin; hesperidin; kaempferol-3-5 β -D-digalatoside; leucine; leucine. iso : ; lysine; methionine; myricetin; narinkin; pimelic acid, α -amino : ; proline; quercetin; robinin; serine; sitosterol-D-glucoside; threminine; Valine; xanthoxhamnin	ยับยั้งเนื้องอก	สารสกัดเมทานอล:น้ำฉีด เข้าช่องท้องในหนูถีบจักร ตัวผู้ ขนาดที่ทำให้ สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง มีค่าเท่ากับ 46 มล/กก

ตารางที่ 2.2 สารเคมีที่พบในครามชนิดต่างๆฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบความเป็นพิษ
(ต่อ)

ชนิดของคราม	สารเคมี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	การทดสอบความเป็นพิษ
<i>purpurea</i> Pers. ชื่ออื่นๆ Purpletephosia	Apollinine; ascorbic; benzoic acid, parahydroxy; betulinic acid; caffeic acid; chalcone,B-hydrowy- benzofuran chiesterol; connmestone,3- 9dihydrowy-2-methowy; connmestone,3- 9dihydrowy; cyaniding; deguelin; degeuelin, dehydro; (-)-derricin,iso: dehydro; ellipline; foavanone, 5-7 dimettrowy-8-(2- 3epoxyflavonid-3- metoxy-3-methy-but- enyl); flemichappaarin B, flemichappaarin C; glabranin, dimetthyl; Kanjone; Karanjic acid ,methyl; karanjin A; lanceolatin lochocarpin, iso; (-)-lonchocarpin,iso; lupeol; maackiain;(-)- macckiain; Maxima isoflavone A; maxima iso flavone C; maxima isoflavone D; maxima	ต้านเชื้อบิดตัว ด้านเชื้อ แบคทีเรีย ป้องกันฟันผุ ต้านเชื้อรา กระตุ้นเชื้อ รา ฆ่าพยาธิ ฆ่าหอย ไส้ แมลง แก้ปวด ด้านการ อักเสบ กดประสาท ส่วนกลาง เสริมฤทธิ์บาร์ บิทูเรต ลดระดับน้ำตาล ในเลือด ลดความดัน โลหิต ยับยั้งการงอกของ พืช ยับยั้งการเป็นพิษต่อ ตับ กระตุ้นแอนไซม์แอล คาไลน์ ฟอสฟาเทส และ กลูตาเมตออกซาโลอะซี เตตทรานส์มีเนส เพิ่ม ระดับ บี วิ รู บี น ใน พลาสมาเป็นพิษต่อ เซลล์	สารสกัดทั้งต้นด้วย เอ ทานอล:น้ำ ฉีดเข้าช่อง ท้องหนูถีบจักรขนาดที่ท่า ให้สัตว์ทดลองตาย ครึ่งหนึ่งมีค่าเท่ากับ 350 มล/กก สารสกัดทั้งต้น ด้วยเอทานอล (70%) ฉีด เข้าช่องท้องหนูถีบจักร ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลอง ตายครึ่งหนึ่งมีค่าเท่ากับ 1.138 ก/กก สารสกัดทั้ง ต้นด้วยเบนซินขนาด100 มล/กก ฉีดเข้าช่องท้องหนู ขาว พบความเป็นพิษ

ตารางที่ 2.3 การใช้ความสกลต่างเพื่อเป็นยารักษาโรคในชนบทของประเทศไทย

ชนิดของคราม	ส่วนของคราม	สรรพคุณ
<i>I. tinctoria</i> Linn.	ราก	เป็นยาแก้พิษของสารหนู
	เปลือก	แก้พิษงูกัด, แก้พิษฝี, แก้ตัวพยาธิ, แก้โลหิตตก, แก้บวม
	ต้น	พอกบัสสวาระให้บริสุทธิ์ แก้กระษัย น้ำบัสสวาระพิการต่างๆ แก้ไข้ตัวร้อน แก้ปวดศีรษะ แก้โรคเลือดตื้น
	ใบ	ดับพิษ แก้ไข้ตัวร้อน แก้ปวดศีรษะ
	ทั้งต้น	แก้บวม บวมพอง เป็นยาระบาย
	ไม่ระบุส่วนที่ใช้	พอกขับบัสสวาระให้บริสุทธิ์ แก้กระษัย น้ำบัสสวาระชุ่มชื้น แก้เนื้อ
<i>B. cusia</i> Brem. (ฮ่อม, ฮ่อมเมือง)	ราก	เป็นยาแก้พิษของสารหนู
	ต้น	พอกบัสสวาระให้บริสุทธิ์ แก้กระษัย น้ำบัสสวาระพิการต่างๆ แก้ไข้ตัวร้อน แก้ปวดศีรษะ แก้โรคเลือดตื้น
	เปลือก	แก้พิษงูกัด, แก้พิษฝี, แก้ตัวพยาธิ, แก้โลหิตตก, แก้บวม
	ใบ	ดับพิษ แก้ไข้ตัวร้อน แก้ปวดศีรษะ
	ทั้งต้น ไม่ระบุส่วนที่ใช้	แก้บวมพอง เป็นยาระบายพอกขับบัสสวาระให้บริสุทธิ์ แก้กระษัย น้ำบัสสวาระชุ่มชื้น แก้เนื้อ
<i>I. hirsuta</i> Linn.	ใบ	ช่วยย่อยทำให้เจริญอาหาร
<i>I. suffruticosa</i> . Mill	ราก	แก้ท้องเดิน
	ทั้งต้น	แก้ไข้ ขับบัสสวาระ เป็นยาระบาย แก้ท้องเสีย
<i>T. purpurea</i> Pers.	ราก	แก้ท้องเดิน
	ทั้งต้น	แก้ไข้ ขับบัสสวาระ เป็นยาระบาย

2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของละอองเกสรเพื่อใช้ในการจัดจำแนกพืชสกุลครามนั้น Nwachukwu and Edeoga (2006) ได้ศึกษาสัณฐานวิทยาของละอองเกสรของพืชสกุลคราม ในเผ่า Galegeae จำนวน 8 ชนิด คือ *I. hirsuta*, *I. paniculata*, *I. pulchra*, *I. priureana*, *I. senegalensis*, *I. stenophylla*, *I. terminalis* และ *I. tinctoria* เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกชนิด

ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ และการกระจายพันธุ์ พบว่าสัณฐานวิทยาของ
ละอองเกสรในครามแต่ละชนิดมีความแปรปรวนไปหลากหลายรูปแบบ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม
คือ ละอองเกสรที่มีรูปร่างทรงกลม (circular) พบในครามชนิด *I. paniculata*, *I. stenophylla*, *I.*
senegalensis และ *I. tinctoria* ส่วนที่ละอองเกสรมีรูปร่างกลมรี (elliptic) พบในครามเพียงชนิด
เดียว คือ *I. hirsuta* และละอองเกสร ที่มีรูปร่างแบบไข่ (oval) พบในครามชนิด *I. terminalis* , *I.*
pulchra และ *I. prieureana*

2.5 จำนวนโครโมโซมของพืชสกุลคราม

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชสกุลครามนั้น Frahm-Leliveld (1966) และ Jahan
(1994) รายงานว่า พืชสกุลครามมีความแปรปรวนในจำนวนของโครโมโซม ซึ่งพบทั้งชนิดที่มีจำนวน
โครโมโซมเป็นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์ และมีค่าจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (X) เท่ากับ 8 ชนิดที่มี
จำนวนโครโมโซม $2n=2x=16$ ซึ่งเป็นจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่ที่พบในพืชสกุลคราม ประกอบด้วย
I. kirilowii, *I. grandiflora* และ *I. pseudotinctoria* ชนิดที่มีจำนวนโครโมโซม $2n=4x=32$
ประกอบด้วย *I. koreana* และชนิดที่มีจำนวนโครโมโซม $2n=6x=48$ ประกอบด้วย *I. decora* ซึ่ง
จำนวนโครโมโซมที่มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของพืชสกุลครามนั้น มีข้อดีคือสามารถนำมา
ศึกษากลไกของกระบวนการวิวัฒนาการของครามที่เป็นชนิดดิพลอยด์ที่เปลี่ยนไปเป็นโพลีพลอยด์

2.6 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอจากการลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืช
โดยตรงมีส่วนได้เปรียบกว่าการศึกษาทางสัณฐานวิทยา เพราะดีเอ็นเอของพืชจะมีความคงตัว และ
ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ประกอบกับสามารถ
ตรวจสอบได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต ความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นจากการตรวจสอบ
ในระดับดีเอ็นเอ เกิดจากการกลายพันธุ์ของเบสในสายนิวคลีโอไทด์ จึงทำให้เกิดลักษณะที่มี
ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาความแปรปรวนหรือความ
หลากหลายทางพันธุกรรมของพืช (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2545) สำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
ของพืช เพื่อใช้ในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิค
ชีววิทยาโมเลกุลมีหลายเทคนิคด้วยกันดังนี้

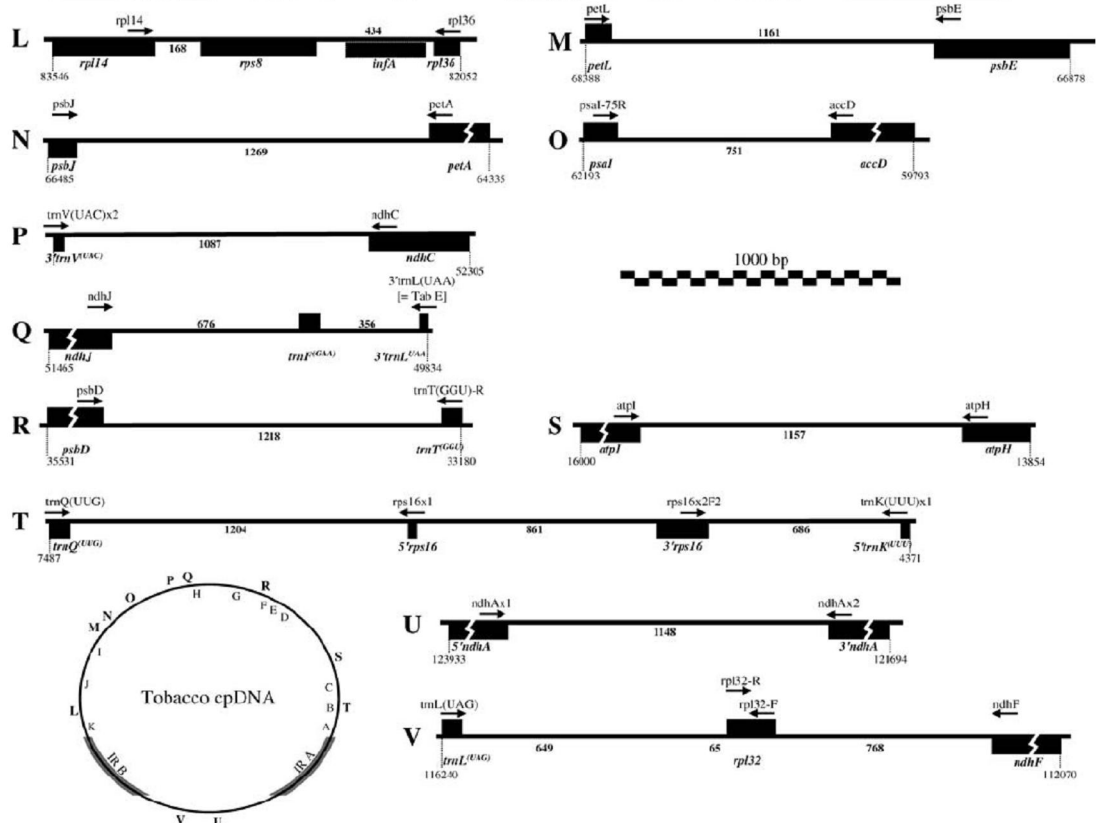
2.6.1 การวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชในส่วนของ ITS

พืชสกุลคราม Choi and Kim (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลคราม
จากลำดับเบสในส่วน internal transcribed spacer (ITS1), ITS2 และ 5.8s rDNA เพื่อบ่งชี้ถึง

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลครามจำนวน 6 ชนิด ทั้งที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ และโพลีพลอยด์ โดยพบว่าลำดับเบสในส่วนของ ITS1 มีความยาวอยู่ในช่วงระหว่าง 230-240 คู่เบส (based pair: bp) ITS2 มีความยาวอยู่ระหว่าง 211-213 คู่เบส ส่วนลำดับเบสของ 5.8S rRNA มีความยาวของเบสทั้งหมด 161 คู่เบส และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้างเดนโดรแกรมพบว่า *I. kirilowii* ($2n=2x=16$) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืชที่เป็นบรรพบุรุษ (common ancestor) มากที่สุด ส่วน *I. decora* ($2n=6x=48$), *I. venulosa*, *I. granddiflora* ($2n=2x=16$) และ *I. koreana* ($2n=4x=32$) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับพืชบรรพบุรุษที่ห่างออกไป ซึ่งบ่งชี้ถึงกระบวนการวิวัฒนาการว่าพืชสกุลครามที่เป็นชนิดโพลีพลอยด์มีวิวัฒนาการสูงกว่าที่เป็นดิพลอยด์

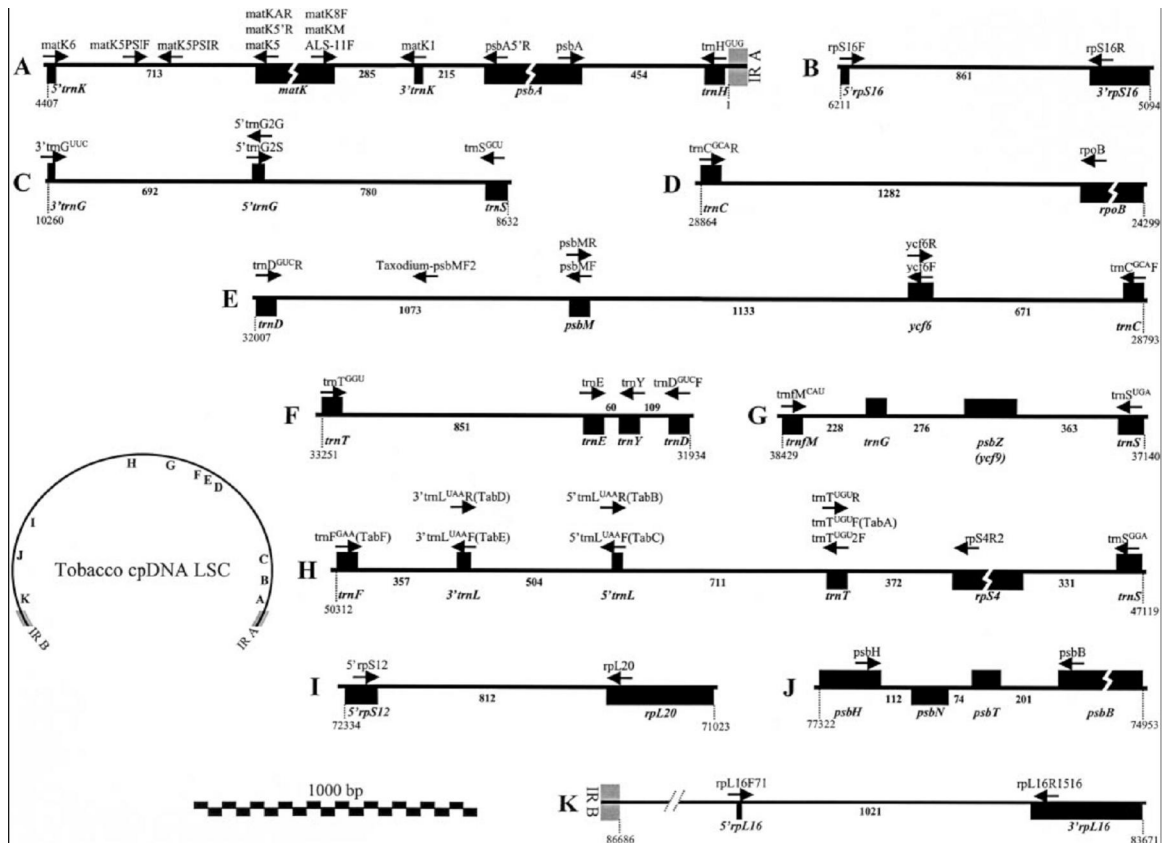
2.6.2 การวิเคราะห์พันธุกรรมในคลอโรพลาสต์ของพืช

Shaw et al. (2005) กล่าวว่าลำดับเบสของดีเอ็นเอในบริเวณ non-coding sequence ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกพืช บ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และกระบวนการวิวัฒนาการของพืชได้ดี โดยแผนที่ดีเอ็นเอที่คลอโรพลาสต์มีบริเวณหลายตำแหน่งด้วยกันที่นิยมนำมาสร้างสายวิวัฒนาการของพืช ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.2 แผนที่ตำแหน่งของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของยาสูบ

ที่มา Shaw et al.2007



ภาพที่ 2.3 แผนที่ตำแหน่งของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของยาสูบ
ที่มา Shaw et al.2005

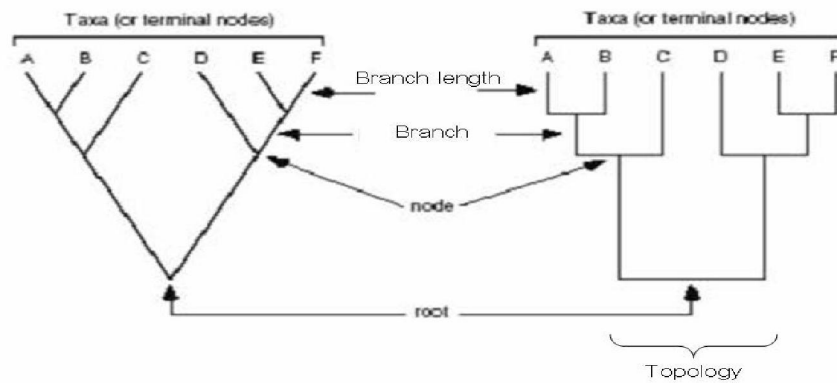
Mcdade and Moody (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Acanthaceae จากลำดับเบสดีเอ็นเอส่วนของ intron และ spacer ของยีน *trnL-trnF* ที่สกัดจากคลอโรพลาสต์ พบว่าลำดับเบสในส่วน of intron และ spacer ของยีน *trnL-trnF* มีความคล้ายคลึงในประชากรที่เป็นสกุลเดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันในประชากรต่างสกุลกัน และยังบ่งชี้ว่าพืชสกุลต่างๆ ที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพืชในสกุล *Eritraria* มากกว่าพืชสกุล *Thumbergia* และ *Mendoncia* ตามลำดับ และสามารถแบ่งกลุ่มของพืชวงศ์ Acanthaceae ออกเป็น 4 กลุ่มที่สำคัญ คือ *Acanthus*, *Barleria*, *Ruellia* และ *Justicia* ต่อมา Moylan et al. (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลย่อยจากลำดับเบสดีเอ็นเอของส่วน internal transcribed spacer nuclear DNA (ITS nrDNA) ที่แยกจากนิวเคลียส และ *trnL-trnF* ที่แยกจากคลอโรพลาสต์ พบว่าลำดับเบสดีเอ็นเอ *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ แยกเผ่าย่อย Strobilanthinae ออกเป็นหนึ่งกลุ่มใหญ่ และไม่สามารถแยกเผ่าย่อย Strobilanthinae ออกเป็นแต่ละสกุลได้ ในขณะที่

ที่ลำดับเบส ดีเอ็นเอของส่วน ITS nrDNA ที่แยกได้จากนิวเคลียสสามารถแยกเผ่าย่อย Strobilantheae ออกเป็น 3 สกุล คือ *Hemigraphis*, *Sericocalyx* และ *Strobilanthes*

2.7 การสร้างสายวิวัฒนาการแบบต้นไม้

ปรีชา ประเทพา (2551) รายงานว่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นสามารถใช้ข้อมูลจากการเปรียบเทียบ “orthologous genes” หรือโปรตีนที่กำหนดการสร้างโดยยีนเดียวกันและสร้างเป็น “phylogenetic tree” ซึ่งแบ่งออกเป็น “molecular phylogenetic tree” เพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนในระหว่างการเกิดการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการและ “species phylogenetic tree” ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา คำว่า “ทรี (tree)” หมายถึง แผนภูมิแบบต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ในธรรมชาติ สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างหรือคล้ายคลึงระหว่างกันและกันอยู่แล้ว ถ้าจะมีการศึกษาการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตโดยใช้หลักเกณฑ์ต่างๆ ที่มนุษย์ตั้งขึ้น ทำให้เกิดศาสตร์ใหม่เรียกศาสตร์นี้ว่า ซิสเต็มมาติกส์ (systematic study) นักชีววิทยาที่สนใจศาสตร์นี้มีความคุ้นเคยกับแผนภูมิหรือเดนโดแกรม (Dendrogram) หรือไฟโลเจเนติกทรี (phylogenetic tree) หรือ กิ่งไม้วิวัฒนาการ ที่เกิดจากการวิเคราะห์ข้อมูลที่เป็นตัวเลขโดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูปที่ใช้กับคอมพิวเตอร์ เดนโดแกรมเป็นคำที่ใช้เรียกแผนภูมิที่แสดงถึงความสัมพันธ์ในเชิงพันธุกรรม แผนภูมินี้เป็นสิ่งสะท้อนให้เห็นภาพรวมๆ ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างกันและกันมากน้อยเท่าใด หรือสะท้อนให้เห็นประวัติความเป็นมาในทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษาในระดับวงศ์ ระดับวงศ์ย่อย หรือ ระดับสกุล เป็นต้น ระเบียบวิธีการสำหรับใช้ในการศึกษาการจัดระบบของสิ่งมีชีวิต โดยการสร้างแผนภูมิในลักษณะเช่นนี้สามารถแบ่งออกเป็นวิธีหลักๆ สองวิธีคือ “Phenetic approach” และ “Cladistic approach” โดยหลักการพื้นฐานแล้ววิธีแรกนั้นจะมองภาพรวมความเหมือนกันของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาว่ามีความเหมือนกันมากน้อยจากข้อมูลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือข้อมูลของยีนหรือดีเอ็นเอ ในขณะที่วิธีหลังนั้นจะมีการพิจารณาถึงข้อมูลทั้งสองแบบนี้ (สัณฐานวิทยาและยีนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ) ในบริบทของสถานภาพของลักษณะหรือ เรียกว่า “character state” ของแต่ละลักษณะที่ศึกษาว่าลักษณะที่ปรากฏให้เห็นในสิ่งมีชีวิตที่ศึกษานั้นเป็นแบบดั้งเดิม (primitive) หรือเป็นแบบที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมแล้ว (derived character) นับว่าเป็นวิธีที่ค่อนข้างจะซับซ้อนมากกว่าวิธีแรก ในกระบวนการ “จัดการข้อมูล” ก่อนจะนำไปสู่การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางพันธุกรรมเพื่อสร้างเป็นแผนภูมิที่เป็นผลลัพธ์ออกมาใช้ในการแปลผลเพื่อใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ที่ปรากฏตามแผนภูมิ อรุณรัตน์ จิวราช (2547) กล่าวว่า phylogenetic

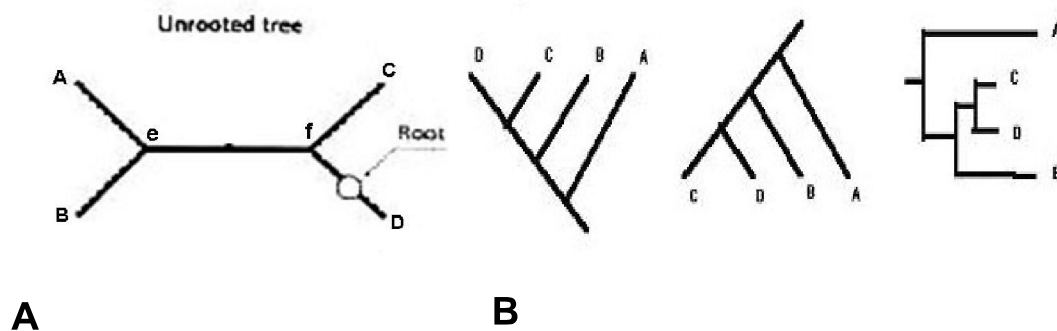
tree หมายถึงแบบแผนที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างหน่วยอนุกรมวิธานจะทำให้เกิดความเข้าใจถึงประวัติของสิ่งมีชีวิตนั้น แต่คำว่าประวัตินั้นคือสิ่งที่เกิดขึ้นและผ่านมาแล้วทั้งไว้แต่เพียงร่องรอยที่เป็นเครื่องบ่งบอกว่ามีเหตุการณ์เช่นนั้นเกิดขึ้นจริง นักวิทยาศาสตร์จึงนำร่องรอยที่เป็นเครื่องบ่งชี้เหล่านี้มาสร้างสมมติฐานซึ่งเป็นรูปแบบเฉพาะของประวัติสิ่งมีชีวิต เรียกว่า Phylogenetic tree นั่นเอง ซึ่งเป็นรูปแบบหรือสัญลักษณ์ที่ทำให้มองเห็นความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตนั้นได้



ภาพที่ 2.4 ภาพแสดงส่วนประกอบของแผนภูมิกิ่งไม้

ที่มา : เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, 2545

Topology	หมายถึงแผนภูมิกิ่งไม้ที่มีการแตกกิ่งออกไป
Root	หมายถึงบรรพบุรุษร่วมกันของหน่วยอนุกรมวิธานใน topology นั้น
Nodes	คือหน่วยอนุกรมวิธานซึ่งอาจจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่ยังมีชีวิตอยู่หรือเป็น บรรพบุรุษ
Branch	หมายถึงตัวที่กำหนดความสัมพันธ์ระหว่างหน่วยอนุกรมวิธานในรูปของบรรพบุรุษ
Branch length	แทนจำนวนของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นใน branch



ภาพที่ 2.5 ภาพแสดงลักษณะของ phylogenetic tree A = Unrooted tree B = Rooted tree

ที่มา : เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, 2545

Unrooted tree (A) เป็นแผนภูมิที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต A B C และ D เท่านั้น ไม่ได้บอกถึงลำดับเหตุการณ์ของวิวัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงมาของยีน A B C และ D แผนภูมินี้ยังบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีน 4 ชนิดที่ห่อหุ้มโลกกัน topology ประกอบด้วย 4 external nodes (A B C และ D) แต่ละ node เป็นตัวแทนของยีน 4 ชนิด และมี 2 internal node (e และ f) ซึ่งเป็นตัวแทนบรรพบุรุษของทั้งสี่ยีน ส่วน branch lengths บ่งบอกถึงระดับของความแตกต่างทางวิวัฒนาการระหว่างยีนทั้งสี่นี้

Rooted tree (B) เป็นแผนภูมิที่บอกถึงลำดับเหตุการณ์ของวิวัฒนาการที่สรุปได้จากข้อมูลที่น่ามาศึกษาและอาจจะไม่ใช่แผนภูมิที่ถูกต้องก็ได้ หรือเป็นแผนภูมิที่บอกถึงลำดับเหตุการณ์ทางวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นจริง phylogenetic analysis นี้ต้องมี out group อย่างน้อย 1 group

ความแตกต่างของ gene tree และ species tree คือเมื่อใช้ข้อมูลระดับโมเลกุลมาสร้าง gene tree จะได้แผนภูมิที่ถูกต้องกว่า species tree ซึ่งใช้ข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา gene tree ไม่ใช่ species tree แต่ก็อธิบายได้ว่า internal node ใน gene tree บ่งบอกถึงความแตกต่างของยีน บรรพบุรุษที่แยกออกไปเป็น 2 ยีนซึ่งมี DNA sequence แตกต่างกันโดยมักเป็นผลมาจากมิวเทชัน internal node ส่วน species tree จะแสดงให้เห็นถึงเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นใหม่ (speciation event) คือ บริเวณที่ประชากรของ ancestral species แยกออกไปเป็นสิ่งมีชีวิต 2 กลุ่มที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้อีก

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุลคราม

ทำการเก็บตัวอย่างพืชสกุลครามจำนวน 8 ชนิด 9 ตัวอย่าง ที่พบในภาคเหนือของประเทศไทย และตัวอย่างที่พบใน University of Hawaii at Manoa จำนวน 1 ชนิด 2 ตัวอย่าง และพืชนอกกลุ่มจำนวน 1 ชนิด คือ *Clitoria* sp. ตามคำแนะนำในรายงานวิจัยของ Schrire et al. (2009) จากนั้นนำพืชสกุลครามทั้ง 8 ชนิด มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตารางที่ 3.1 จำนวนตัวอย่าง ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง และหมายเลขตัวอย่าง

ลำดับที่	ชนิด	location	หมายเลขตัวอย่าง (KKU Herbarium)
1	<i>Indigofera lacei</i>	ดอยเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่	Sawai 487
2	<i>I. hendecaphylla</i> var. <i>hendecaphylla</i>	ออบหลวง จังหวัดเชียงใหม่	Sawai 436
3	<i>I. caloneura</i> 1	ดอยอ่างขาง จังหวัดเชียงใหม่	Sawai 467
4	<i>I. caloneura</i> 2	ออบหลวง จังหวัดเชียงใหม่	No specimen
5	<i>I. sootepensis</i>	ดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่	Sawai 899
6	<i>I. dosua</i>	ดอยอ่างขาง จังหวัดเชียงใหม่	Sawai 489
7	<i>I. emmae</i>	ดอยอ่างขาง จังหวัดเชียงใหม่	Sawai 1025
8	<i>I. linnaei</i>	ออบหลวง จังหวัดเชียงใหม่	Sawai 989
9	<i>I. hirsuta</i>	ออบหลวง จังหวัดเชียงใหม่	Sawai
10	<i>I. spicata</i> Forssk, Hawaii1	University of Hawaii at Manoa	Kamonporn
11	<i>I. spicata</i> Forssk, Hawaii 2	University of Hawaii at Manoa	Kamonporn
12	<i>Clitoria</i> sp.	University of Hawaii at Manoa	Kamonporn

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม

น้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบอ่อนแห้งที่แช่ในซิลิกาเจลของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Qiagen ประเทศเยอรมันนี ชื่อชุดน้ำยา Plant Dneasy Mini Kits ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอมีดังนี้

ชั่งเนื้อเยื่อตัวอย่างใบอ่อนแห้งจากการแช่ซิลิกาเจลของพืชสกุลครามให้ได้น้ำหนัก 0.05 กรัม เติม AP1 buffer 400 ไมโครลิตร (μl) และเติมเอนไซม์ RNase ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) นำไปบดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เมื่อครบเวลานำมาเติม AP2 buffer 130 ไมโครลิตร และแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 12,470xg อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใส่ลงในคอลัมน์สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,470xg อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ย้ายสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ไปใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ปรับปริมาตรให้ได้ 450 ไมโครลิตร เติม AP3/E buffer 675 ไมโครลิตร กลับหลอดให้สารละลายเข้ากันดี แล้วดูคมา 650 ไมโครลิตร นำไปใส่ลงในคอลัมน์สีขาว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,722xg อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ดูดสารละลายที่เหลือลงในคอลัมน์สีขาวอันเดิม ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,722xg อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง เติม AW buffer 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์สีขาวอันเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,722xg อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง เติม AW buffer 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,722xg อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้งหนึ่ง และเทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง นำคอลัมน์สีขาววางลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์เติม AE buffer 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,722xg อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์นาโนดรอป

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS และ Chloroplast DNA

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของนิวคลีอัส ITS คือ ITS4 & ITS5 และ Chloroplast DNA มีจำนวนทั้งหมด 8 คู่ 16 เส้น โดยรายละเอียดของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 จำนวนและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียส
และคลอโรพลาสต์

ลำดับที่	ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' 3'	อ้างอิง
1	ITS4*	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al., 1990
2	ITS5*	GGA ACA ATG CTG AAA ATG AAG G	White et al., 1990
3	rpl16F71*	GCT ATG CTT AGT GTG TGA CTC GTT G	Shaw et al., 2005
4	rpl16R1516*	CCC TTC ATT CTT CCT CTA TGT TG	Shaw et al., 2005
5	psbA	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	Shaw et al., 2005
6	trnH ^{GUG}	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	Shaw et al., 2005
7	trnL ^{UAG}	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT	Shaw et al., 2007
8	rpl132	CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C	Shaw et al., 2007
9	trnI _C	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Taberlet et al., 1991
10	trnI _F	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Taberlet et al., 1991
11	trnT ^{GGU}	CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG	Shaw et al., 2005
12	trnD ^{GUC} F	ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC	Shaw et al., 2005
13	trnE ^{UUC}	AGG ACA TCT CTC TTT CAA GGA G	Shaw et al., 2005
14	trnY ^{GUA}	CCG AGC TGG ATT TGA ACC A	Shaw et al., 2005
15	trnS ^{UGA}	GAG AGA GAG GGA TTC GAA CC	Shaw et al., 2005
16	trnM ^{CAU}	CAT AAC CTT GAG GTC ACG GG	Shaw et al., 2005
17	rps162F2	AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC	Shaw et al., 2007
18	trnK ^{UUU}	TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC	Shaw et al., 2007

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ลำดับที่	ส่วนประกอบของสารละลาย	ปริมาตรต่อหลอด (ไมโครลิตร)
1	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	13.3
2	10x PCR buffer	2.5
3	50 mM MgCl ₂	1.5
4	20 mM dNTP mix	2
5	1% Bovine Serum Albumin	0.5
6	5 U/ μ l Taq DNA polymerase	0.7
7	10 mM/ μ l Forward Primer	1
8	10 mM/ μ l Reverse Primer	1
9	5 μ g/ μ l genomic DNA	2.5
	รวม	25

เมื่อผสมส่วนประกอบต่างๆ ตามตารางที่ 3.3 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้เครื่องพีซีอาร์ DNA Engine DYAD™ Peltier Thermal cycler (MJ research, Inc) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อโปรแกรมแต่ละคู่ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ITS4 ITS5 มีสภาวะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที

Extension ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

trnLC-trnLF มีสภาวะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ
rpL16F71-rpL16R1516 มีสถานะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 1 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

psbA-trnH มีสถานะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 1 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

trnS^{UGA} - trnI^{CAU} มีสถานะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 1 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

rpS162F2- trnK^{UUU} มีสถานะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

ขั้นที่ 1 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 51.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.50 นาที

จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

trnD^{GUC} - trnE^{UUC} มีสภาวะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 1 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

trnT^{GGU} - trnY^{GUA} มีสภาวะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 1 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

trnL-rpL132 มีสภาวะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 1 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 56.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

เก็บสารละลายผสมผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR products) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel ที่ย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ โดยเปรียบเทียบขนาดน้ำหนักโมเลกุลจากการใช้ Hyper ladder IV (Bioline) และวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometry จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปหาลำดับเบส โดยใช้ยาสำเร็จรูป ExoSap (Exonuclease and Shrimp Alkaline Phosphatase (USB) โดยใช้สภาวะอุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำผลผลิตของพีซีอาร์ไปหาลำดับเบสที่ The Center for

Advanced Studies in Genomics, Proteomics and Bioinformatics (ASGPB), University of Hawaii at Manoa

นำลำดับเบสที่ได้มาแก้ไขและประกอบกับสายคู่สมโดยใช้โปรแกรม Sequencer v. 4.9 (Gene Codes Corporation, 2009) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม Se-Al Carbon v 2.0a1 (Rambaut., 1996) หรือใช้โปรแกรม MUSCLE (Edgar, 2004)

3.4 การวิเคราะห์ Phylogenetic tree

นำลำดับเบสมาสร้างเดนโดรแกรมด้วยวิธี PAUP*4.0b10 (Swofford, 2002) แล้ววิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ สร้างเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรม MEGA 4.1 (Kumar et al., 2004) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามและพืชในกลุ่มที่นำมาศึกษา

3.5 ระยะเวลาทำการวิจัยและแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

ระยะในการดำเนินการวิจัย 1 ปี เริ่มจากวันที่ 1 ตุลาคม 2550 ถึง 30 กันยายน 2551 โดยมีแผนการดำเนินการวิจัยเป็นดังนี้

ตารางที่ 3.4 ตารางแผนดำเนินงานวิจัย

หัวข้อ	เดือน (พ.ศ. 2551-2552)											
	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
1. สำรวจและเก็บตัวอย่างพืช	← →											
2. สกัดดีเอ็นเอพืชสกุลคราม				← →								
3. สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลคราม					← →					→		
4. วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลคราม								← →				
5. สรุปรายงานการวิจัย											← →	

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ University of Hawaii at Manoa

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การรวบรวมพันธุ์ฐานวิทยาของพืชสกุลคราม จากงานวิจัยของสว มัธยา (2550)

4.1.1 *Indigofera caloneura* ชื่อพื้นเมือง- ไม้มือ ครามป่า (เชียงใหม่) จุยกาเหมือ จุยกาหมี่ ซีลานอเกาะ (กะเหรี่ยง เชียงใหม่)

ไม้พุ่ม สูง 1-3 เมตร กิ่งอ่อนมีขนหนาแน่นคล้ายกำมะหยี่ ขนมีแขนยาวต่างกัน ใบ เป็นใบประกอบมี 1 ใบย่อย เรียงสลับ หูใบรูปแถบถึงรูปสามเหลี่ยมแคบ ยาว 4-8 มิลลิเมตร กว้าง 1 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม ขอบเรียบ ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง หูใบย่อยรูปแถบถึงรูปสามเหลี่ยมแคบ ยาว 2-6 มิลลิเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม ก้านใบยาว 1-1.7 เซนติเมตร มีขนหนาแน่น ก้านใบย่อยยาว 3-5 มิลลิเมตร แผ่นใบรูปไข่ถึงไข่กว้าง ยาว 11-14 (-25) เซนติเมตร กว้าง 5-8 (-13) เซนติเมตร ปลายแหลม มีติ่งแหลม ยาว 2 มิลลิเมตร ฐานมน ขอบเรียบ หลังใบเกลี้ยง ท้องใบมีขนหนาแน่น ขนแขนยาวต่างกัน เส้นแขนงใบมี 19-25 คู่ **ช่อดอก** ยาว (-8) 15-20 เซนติเมตร มีขนหนาแน่น ใบประดับรูปสามเหลี่ยม ยาว 3-5 มิลลิเมตร ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง ปลายเรียวแหลม ก้านดอกย่อย ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น **กลีบเลี้ยง** มีหลอดกลีบรูปถ้วย ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร กลีบรูปสามเหลี่ยม ยาว 0.5-1.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.5-1 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบมีขน ผิวด้านบนนอกมีขน ผิวด้านในเกลี้ยง **กลีบดอก** มีสีขาวครีม กลีบกลางรูปไข่กว้างถึงเกือบมน ยาว 8-10 มิลลิเมตร ปลายมน หรือเว้าตื้น ฐานมน ขอบเรียบ ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้างรูปขอบขนานถึงไข่กลับเล็กน้อย ยาว 5- 6.5 มิลลิเมตร กว้าง 2.5-3 มิลลิเมตร ก้านกลีบยาว 0.5-1 มิลลิเมตร ปลายมน ฐานเบี้ยว ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ล่างรูปไข่กลับ ยาว 8-10 มิลลิเมตร กว้าง 2.5-3 มิลลิเมตร ฐานสอบเรียว ขอบมีขนครุย ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง **เกสรเพศผู้** มีหลอดเกสรยาว 7-8 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 1-1.5 มิลลิเมตร อับเรณูยาว 0.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่นที่ฐาน **เกสรเพศเมีย** มีรังไข่เกลี้ยง มี 10-15 ออวูล ฝัก รูปทรงกระบอกเหยียดตรง ปลายโค้งเล็กน้อย ยาว 4-5 เซนติเมตร มีขนหนาแน่น เมล็ด รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ยาว 2 มิลลิเมตร กว้าง 1.5 มิลลิเมตร เกลี้ยง มันวาว

4.1.2 *Indigofera dosua* ชื่อพื้นเมือง- ถั่วดิน ครามป่า

ไม้พุ่ม สูง 1-3 เมตร กิ่งอ่อนมีขนหนาแน่นคล้ายกำมะหยี่ ขนยาวต่างกัน ขนสีขาวเทา ใบ เป็นใบประกอบ เรียงแบบสลับ หูใบรูปสามเหลี่ยมแคบ ยาว 8-11 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม ขอบ

เป็นขนครุย ก้านใบยาว 3-5 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น แกนกลางยาว (6-)10-16 เซนติเมตร ใบย่อยมี 24-37 ใบ เรียงตรงข้ามที่ปลายใบ หรือพบเรียงสลับที่ฐานใบ ไม่มีหูใบย่อย ก้านใบย่อย ยาว 0.5-1 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น แผ่นใบรูปขอบขนาน ยาว 15-18 มิลลิเมตร กว้าง 3-5 มิลลิเมตร ปลายมน มีติ่งหนาม ยาว 0.5 มิลลิเมตร ฐานมน ขอบมีขน หลังใบและท้องใบมีขนหนาแน่น เส้นแขนงใบไม่ชัดเจน **ช่อดอก** ยาว (9-) 15-25 เซนติเมตร มีขนหนาแน่น ใบประดับรูปสามเหลี่ยม ปลายเรียวแหลม ขอบเป็นขนครุย ใบประดับยาว 8-10 มิลลิเมตร กว้าง 1.5 มิลลิเมตร ก้านดอกย่อย ยาว 1-2 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น **กลีบเลี้ยง** มีหลอดกลีบรูปถ้วยยาว 1-1.5 มิลลิเมตร กลีบรูปสามเหลี่ยม ยาว 1 มิลลิเมตร กว้าง 1-1.5 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย **กลีบดอก** มีสีชมพู กลีบกลางรูปไข่กว้าง ยาว 8-11 มิลลิเมตร กว้าง 6-7 มิลลิเมตร ปลายแหลมถึงเว้าตื้น ฐานมน ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้างรูปรีไม่สมมาตร ยาว 7-8 มิลลิเมตร กว้าง 3-3.5 มิลลิเมตร ปลายมน ฐานเบี้ยว ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนบริเวณขอบกลีบ ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ล่างยาว 7-8 มิลลิเมตร กว้าง 3-3.5 มิลลิเมตร ฐานสอบเรียว ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนบริเวณใกล้ขอบกลีบ ผิวด้านในเกลี้ยง **ถุง** หรือจะงอย ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร **เกสรเพศผู้** มีหลอดเกสรยาว 7-8 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 1-1.5 มิลลิเมตร อับเรณูยาว 0.5 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย** รังไข่มีขนหนาแน่น หรือเกือบเกลี้ยง มี 7-9 ออวูล **ฝัก** รูปทรงกระบอก เหยียดตรง ยาว 25-30 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น เมล็ด เกือบกลม ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร กว้าง 1.5-2 มิลลิเมตร มันวาว

4.1.3 *Indigofera emmae* ชี้อพันธ์- ความคืบหน้า

ไม้พุ่ม สูง 30-90 เซนติเมตร กิ่งอ่อนมีขนแขนยาวเท่ากันและมีขนสั้นนุ่ม **ใบ** เป็นใบประกอบ เรียงแบบเวียน หูใบรูปสามเหลี่ยมแคบ ยาว (2-) 3-5 มิลลิเมตร กว้าง 1.5-2 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม ขอบเป็นขนครุย ก้านใบยาว 7-12 มิลลิเมตร มีขน แกนกลางยาว 2-4 เซนติเมตร มีขน ใบย่อย มี 9-13 ใบ เรียงตรงข้าม หูใบย่อยรูปแถบยาว 1 มิลลิเมตร ก้านใบย่อยยาว 1-1.5 มิลลิเมตร มีขน แผ่นใบรูปรี ยาว (11-) 15-20 มิลลิเมตร กว้าง 7-10 มิลลิเมตร ปลายมน มีติ่งแหลม ยาว 1 มิลลิเมตร ฐานมน ขอบเรียบ หลังใบและท้องใบมีขนหนาแน่น ขนยาวเท่ากัน **ช่อดอก** ยาว 3-5 มิลลิเมตร มีขน ใบประดับรูปสามเหลี่ยม ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย ก้านดอกย่อยยาว 2-3 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น **กลีบเลี้ยง** มีหลอดกลีบรูปถ้วย ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร กลีบรูปสามเหลี่ยม ยาว 1.5-2.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง **กลีบดอก** มีสีชมพู กลีบกลางรูปรีถึงถึงรูปเกือบมน

ยาว 8-9.5 มิลลิเมตร กว้าง 6-6.5 มิลลิเมตร ปลายมนมีติ่งแหลมสั้น ฐานสอบเรียว ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้างรูปขอบขนานถึงคล้ายลิ้น ยาว 7-8 มิลลิเมตร กว้าง 1.5-2 มิลลิเมตร ก้านกลีบยาว 0.5 มิลลิเมตร ปลายมน ฐานเบี้ยว ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ล่างยาว 7-8 มิลลิเมตร กว้าง 2.5-3 มิลลิเมตร ปลายแหลม ฐานสอบเรียว ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง มีถุง หรือจะงอย ยาว 1 มิลลิเมตร **เกสรเพศผู้** มีหลอดเกสรยาว 6-8 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 1-1.5 มิลลิเมตร อับเรณูยาว 1 มิลลิเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่นที่ฐาน **เกสรเพศเมีย** มีรังไข่ชนกระจายทั่วไป มี 7-10 ออวูล

4.1.4 *Indigofera hendecaphylla* var. *hendecaphylla* ชื่อพื้นเมือง- ความเครือ

ไม้พุ่มทอดเลื้อย กิ่งอ่อนมีขนหนาแน่น ขนมีแขนยาวเท่ากัน หนูปรูปหอกยาว 5-10 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม ขอบเรียบ ผิวด้านนอกมีขนกระจายทั่วไป มีสัน ผิวด้านในเกลี้ยง ก้านใบยาว 1-3 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น แกนกลางยาว 1-3.5 มิลลิเมตร **ใบ** เป็นใบประกอบ เรียงแบบสลับ ใบย่อยมี 5-11 ใบ เรียงสลับ พบน้อยที่เรียงตรงข้าม หรือเกือบตรงข้าม หนูปย่อยรูปแถบ ยาว 0.5 มิลลิเมตร ก้านใบย่อยยาว 1-2 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น แผ่นใบรูปไข่กลับแกมขอบขนาน ยาว (6-) 15-20 มิลลิเมตร กว้าง 4-8 มิลลิเมตร ปลายมน มีติ่งแหลม ยาว 0.5 มิลลิเมตร หรือเว้าตื้น ฐานมน ขอบเรียบ มีขน หลังใบเกลี้ยง ท้องใบมีขนหนาแน่น เส้นกลางใบเว้าด้านบน ฐานด้านล่าง เส้นแขนงใบไม่ชัดเจน **ช่อดอก** ยาว 3-7 มิลลิเมตร (-13) เซนติเมตร มีขน ใบประดับรูปไข่ถึงรูปสามเหลี่ยม ยาว 1-2 มิลลิเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขน ผิวด้านในเกลี้ยง ก้านดอกย่อย ยาว 1-1.5 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น **กลีบเลี้ยง** มีหลอดกลีบเลี้ยงรูปถ้วย ยาว 1 มิลลิเมตร กลีบรูปหอก ยาว 2-3 มิลลิเมตร กว้าง 0.8-1 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย **กลีบดอก** มีสีชมพู กลีบกลางรูปไข่กลับถึงเกือบมน ยาว 5.5-6 มิลลิเมตร กว้าง 6-6.5 มิลลิเมตร ปลายเว้ามน ฐานรูปลิ้น ขอบเรียบ ผิวด้านนอกเกลี้ยง มีขนที่ปลายกลีบ ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้างรูปไข่กลับ ไม่สมมาตร ยาว 5-6 มิลลิเมตร กว้าง 2-3 มิลลิเมตร ก้านกลีบยาว 0.5 มิลลิเมตร ปลายมน ขอบเรียบ ฐานสอบเรียว ผิวด้านนอกและผิวด้านในเกลี้ยง มีถุง หรือจะงอย ยาว 1 มิลลิเมตร **เกสรเพศผู้** มีหลอดเกสรยาว 4-5 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 0.5-1 มิลลิเมตร อับเรณูยาว 0.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร มีขนที่ฐานเล็กน้อย **เกสรเพศเมีย** มีรังไข่ชนหนาแน่น มี 7-10 ออวูล **ฝัก** รูปทรงกระบอก ยาว 20-30 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-2.5 มิลลิเมตร **เมล็ด** รูปทรงกระบอก เหยียดตรง ยาว 2-2.5 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร เกลี้ยง

4.1.5 *Indigofera hirsuta* ชื่อพื้นเมือง- ครามขน

ไม้พุ่ม สูงประมาณ 1 เมตร กิ่งอ่อนมีขนหนาแน่น มีแขนยาวต่างกันมาก มีสีดำ ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร **ใบ** เป็นใบประกอบ หูใบรูปแถบ ยาว 10-17 มิลลิเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง ก้านใบยาว 1-2 เซนติเมตร แกนกลางยาว 2.5-6 เซนติเมตร มีขนหนาแน่น ใบย่อย มี 5-7 ใบ แผ่นใบรูปรี หรือไข่กลับ ปลายมน หรือเว้ามน มีติ่งแหลม ยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ฐานรูปลิ้น ขอบเป็นขนครุย หลังใบมีขนหนาแน่น แขนยาวต่างกันมาก ท้องใบมีขนหนาแน่น มีแขนยาวต่างกันมาก หูใบย่อยรูปแถบ ยาว 1-3 มิลลิเมตร ก้านใบย่อย ยาว 2-3 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น ช่อดอก ยาว 10-25 เซนติเมตร มีขนหนาแน่น ใบประดับรูปแถบ หรือรูปสามเหลี่ยมแคบ ยาว 3.5-4 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง **กลีบเลี้ยง** มีหลอดยาว 0.5 มิลลิเมตร กลีบรูปหอก ยาว 2.5-3 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่น มีสีดำ ผิวด้านในเกลี้ยง **กลีบดอก** มีสีชมพู กลีบกลางรูปมน ยาว 4 มิลลิเมตร กว้าง 2.5-3 มิลลิเมตร ปลายเว้ามน ฐานรูปลิ้น ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้าง ยาว 4.5 มิลลิเมตร กว้าง 1 มิลลิเมตร ก้านกลีบยาว 0.5 มิลลิเมตร ปลายมน ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านบนนอกมีขนหนาแน่นที่บริเวณโคนกลีบ ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ล่าง ยาว 5 มิลลิเมตร กว้าง 1.5 มิลลิเมตร มีถุง หรือจะงอย ยาว 1 มิลลิเมตร ปลายมน ฐานสอบเรียว ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านบนนอกมีขนบริเวณสันกลีบและขอบกลีบ ผิวด้านในเกลี้ยง **เกสรเพศผู้** มีหลอดเกสร ยาว 4 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 0.5-1 มิลลิเมตร อับเรณูยาว 0.3-0.4 มิลลิเมตร ปลายแหลม **เกสรเพศเมีย** มีรังไข่ 5-8 ออวูล **ฝัก** รูปทรงกระบอก เหยียดตรง ยาว 14-16 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น **เมล็ด** ยาว 1 มิลลิเมตร กว้าง 1 มิลลิเมตร เกลี้ยง

4.1.6 *Indigofera lacei* ชื่อพื้นเมือง- คราม ครามเขา ตะกลุมิ (เชียงใหม่)

ไม้พุ่ม สูง 1-4 เมตร กิ่งอ่อนเรียวกลม หรือเกือบเรียวกลม ขนมีแขนยาวเท่ากันและต่างกัน **ใบ** เป็นใบประกอบ เรียงแบบเวียน หูใบรูปแถบ ยาว 7-10 มิลลิเมตร ก้านใบยาว 0.5-1.5 เซนติเมตร มีขนหนาแน่น แกนกลางยาว 6-11 เซนติเมตร ใบย่อยมี (23-) 31-35 ใบ เรียงตรงข้าม หรือเกือบตรงข้าม แผ่นใบรูปรี หรือรูปไข่กลับแคบ ยาว 10-14 มิลลิเมตร กว้าง 6-7 มิลลิเมตร ฐานใบมน หรือรูปลิ้น ขอบเรียบ ปลายเป็นติ่งหนาม หลังใบและท้องใบมีขนแขนยาวเท่ากันและต่างกัน เส้นกลางใบ เว้าด้านบน หนูนด้านล่าง เส้นแขนงใบมี 15-17 คู่ ไม่ชัดเจน **ช่อดอก** ยาว 15-25 เซนติเมตร ใบประดับรูปแถบยาว 3-5 มิลลิเมตร ก้านดอกย่อย ยาว 4-5 มิลลิเมตร มีขน **กลีบเลี้ยง** มีหลอดกลีบ

รูปถ้วย ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร กลีบรูปสามเหลี่ยม ยาว 1 มิลลิเมตร กว้าง 1 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขน ผิวด้านในเกลี้ยง **กลีบดอก** มีสีชมพูเข้ม หรือแดง กลีบกลางรูปไข่กลับ หรือรี ยาว 9-10.5 มิลลิเมตร กว้าง 5- 6.5 มิลลิเมตร ปลายแหลมฐานมน ขอบเรียบ ผิวด้านนอกมีขน ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้างรูปขอบขนาน ยาว 8.5-9.5 มิลลิเมตร กว้าง 1.5-2.5 มิลลิเมตร ปลายมน หรือแหลม ฐานตัด ขอบเรียบ ผิวด้านนอกเกลี้ยง มีขนเฉพาะฐานกลีบ ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ล่างยาว 8-9.5 มิลลิเมตร กว้าง 1.5-2 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนเฉพาะปลายกลีบ ผิวด้านในเกลี้ยง มีถุง หรือจะงอยยาว 1 มิลลิเมตร **เกสรเพศผู้** มีหลอดเกสร ยาว 6-7 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 1-1.5 มิลลิเมตร อับเรณูยาว 1 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย** มีรังไข่เกลี้ยง มี 6-9 ออวูล ก้านเกสร ยาว 3-4 มิลลิเมตร **ฝัก** มีลักษณะทรงกระบอก ยาว 2.5-4 เซนติเมตร เกลี้ยง **เมล็ด** รูปทรงกระบอก เหยียดตรง ยาว 2.5-3 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เกลี้ยง

4.1.7 *Indigofera linnaei* ชื่อพื้นเมือง- ครามเลื้อย

ไม้พุ่มทอดเลื้อย กิ่งอ่อนมีขน แขนยาวเท่ากันและต่างกัน **ใบ** เป็นใบประกอบ เรียงแบบสลับ ใบรูปสามเหลี่ยม ยาว 3-4 มิลลิเมตร กว้าง 2 มิลลิเมตร ปลายแหลมเข้ม ยาว 1-2 มิลลิเมตร ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนที่ฐาน ผิวด้านในเกลี้ยง ก้านใบยาว 1-3 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น แกนกลางยาว (7-) 10-15 มิลลิเมตร ใบย่อย มี 5-11 ใบ เรียงแบบสลับ ใบย่อยรูปสามเหลี่ยม ยาว 0.5 มิลลิเมตร ปลายแหลม ร่วงง่าย ก้านใบย่อยยาว 0.5-1 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น แผ่นใบรูปไข่กลับ หรือรูปรี ยาว 10-14 มิลลิเมตร กว้าง 3.5-5.5 มิลลิเมตร ปลายมน มีติ่งแหลมยาว 0.1-0.2 มิลลิเมตร หรือเว้าตื้น ฐานรูปลิ้น ขอบเรียบ มีขน หลังใบส่วนใหญ่มีขนแขนยาวต่างกัน ท้องใบมีขนแขนยาวเท่ากัน พบน้อยที่ยาวต่างกัน เส้นกลางใบเว้าด้านบน ฐานด้านล่าง เส้นแขนงใบไม่ชัดเจน **ช่อดอก** ยาว 3-5 มิลลิเมตร ออกที่ซอกใบ มีขน ใบประดับรูปไข่กว้าง ยาว 2 มิลลิเมตร กว้าง 1.5 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกเกลี้ยง ผิวด้านในมีขน ก้านดอกย่อยยาว 0.1-0.2 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น **กลีบเลี้ยง** มีหลอดกลีบรูปถ้วย ยาว 1-1.5 มิลลิเมตร กลีบรูปหอกถึงรูปสามเหลี่ยม ยาว 2 มิลลิเมตร กว้าง 1 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง **กลีบดอก** มีสีชมพู กลีบกลางรูปไข่กลับ ยาว 3-4 มิลลิเมตร กว้าง 3 มิลลิเมตร ก้านกลีบยาว 0.1-0.2 มิลลิเมตร ปลายมนหรือเว้าตื้น ขอบเรียบ ฐานเบี้ยว ผิวด้านนอกและผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้างยาว 3-3.5 มิลลิเมตร กว้าง 1 มิลลิเมตร ปลายมน ขอบเรียบ ฐานเบี้ยว ผิวด้านนอกและผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ล่างยาว 3-3.5 มิลลิเมตร กว้าง 1 มิลลิเมตร ปลายมน

ขอบเรียบหรือเป็นขนครุยเล็กน้อย ฐานสอบเรียว ผิวด้านนอกและผิวด้านในเกลี้ยง **เกสรเพศผู้** มีหลอดเกสรยาว 2 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 0.1 มิลลิเมตร อับเรณูยาว 0.1 มิลลิเมตร กว้าง 0.1 มิลลิเมตร เกลี้ยง **เกสรเพศเมีย** มีรังไข่เกลี้ยง มี 2 ออวูล **ฝัก** มีลักษณะมน หรือกลม ยาว 3-3.5 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-2 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่น **เมล็ด** ยาว 1-1.5 มิลลิเมตร กว้าง 1 มิลลิเมตร เกลี้ยง มันวาว

4.1.8 *Indigofera sootepensis* ชื่อพื้นเมือง- ความป่า

ไม้พุ่ม สูง 1-2 เมตร มีขน แขนยาวเท่ากัน สีนํ้าตาลกระจายทั่วไป ใบ เป็นใบประกอบ เรียงแบบสลับ ใบยาว 5-8 มิลลิเมตร ก้านใบยาว 2-10 มิลลิเมตร มีขนสั้นนุ่ม แกนกลางยาว 27-33 เซนติเมตร ใบย่อย มี 35-43 ใบ เรียงตรงข้าม ใบย่อยรูปแถบ ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร ก้านใบย่อยยาว 1-3 มิลลิเมตร แผ่นใบรูปขอบขนาน หรือหอกกลับ รูปไข่ ฐานแหลม หรือมน ยาว 1.5-2.5 เซนติเมตร กว้าง 1-1.5 เซนติเมตร ปลายมน หรือมีติ่งแหลม ยาว 1 มิลลิเมตร ขอบเรียบ หลังใบและท้องใบมีขน เส้นแขนงใบมี 10-13 คู่ **ช่อดอก** ยาว 7-20 เซนติเมตร ใบประดับรูปสามเหลี่ยม หรือรูปหอก ยาว 2-3 มิลลิเมตร กว้าง 0.5 มิลลิเมตร ปลายแหลม ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ก้านดอกย่อยยาว 1.5-2 มิลลิเมตร **กลีบเลี้ยง** มีหลอดรูปถ้วยตื้น ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร กว้าง 2.5 มิลลิเมตร สีดำ กลีบรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก ผิวด้านนอกมีขน ผิวด้านในเกลี้ยง **กลีบดอก** มีสีชมพู หรือสีแดง กลีบกลางรูปไข่ ยาว 11-14 มิลลิเมตร กว้าง 5-6 มิลลิเมตร ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ข้างยาว 13-15 มิลลิเมตร กว้าง 2.5-3 มิลลิเมตร ขอบเป็นขนครุย ผิวด้านนอกมีขนสั้นนุ่ม ผิวด้านในเกลี้ยง กลีบคู่ล่างยาว 13-15 มิลลิเมตร กว้าง 2-3 มิลลิเมตร ขอบมีขนครุย ฐานหรือจะงอย ยาว 1 มิลลิเมตร ผิวด้านนอกมีขนสั้นนุ่ม ผิวด้านในเกลี้ยง **เกสรเพศผู้** มีหลอดเกสรยาว 10-12 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 1-1.5 มิลลิเมตร **เกสรเพศเมีย** มีรังไข่มน มี 8-10 ออวูล ก้านเกสรเกลี้ยง **ฝัก** รูปทรงกระบอก เหยียดตรง ยาว 40-50 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร มีขน เมล็ด รูปทรงกระบอก ยาว 2.5-3 มิลลิเมตร กว้าง 2-2.5 มิลลิเมตร เกลี้ยง ผิวขรุขระ



ภาพที่ 4.1 สัณฐานวิทยาของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม

ก = *Indigofera caloneura*

ข = *Indigofera dosua*

ค = *Indigofera emmae*

ง = *Indigofera hendecaphylla* var. *hendecaphylla*



ภาพที่ 4.1 สัณฐานวิทยาของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม (ต่อ)

จ = *Indigofera hirsuta*

ฉ = *Indigofera lacei*

ช = *Indigofera linnaei*

ฅ = *Indigofera sootepensis*



ภาพที่ 4.1 สัณฐานวิทยาของพืชสกุลคราม และพืชนอกกลุ่ม (ต่อ)

ญ = *I. spicata* Forssk (Hawaii1)

ณ = *I. spicata* Forssk (Hawaii 2)

ณ = *Clitoria* sp.

4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม

จากการสกัดดีเอ็นเอพืชสกุลครามจำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Plant Dneasy Mini Kits เมื่อนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างแห้งของพืชสกุลครามมีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์ โดยมีค่าความบริสุทธิ์ (อัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร) อยู่ระหว่าง 1.75-1.87 และปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณระหว่าง 24.28 – 84.74 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งในพืชสกุลครามชนิด *I. caloneura* 1 มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ 24.28 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และพืชสกุลครามชนิด *I. dosua* มีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดที่ 84.74 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ดังตารางที่ 4.1

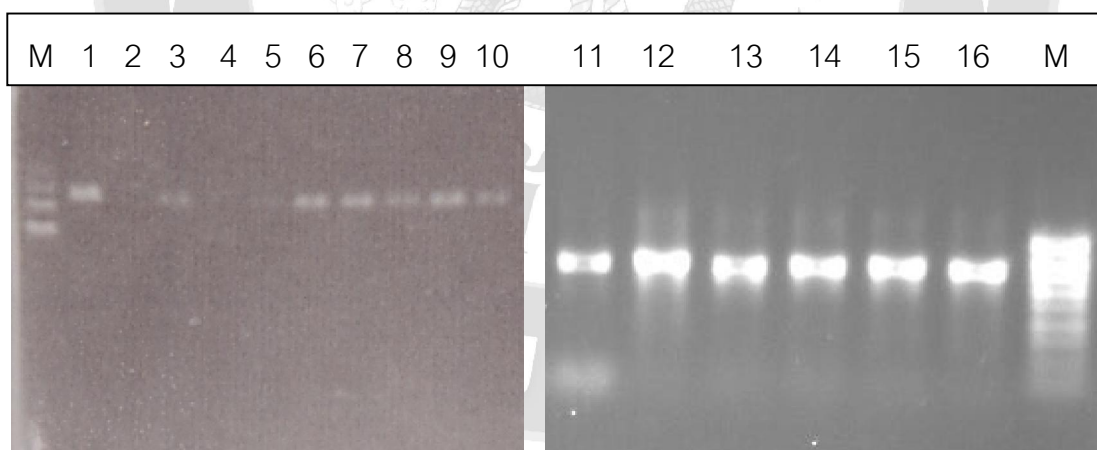
ตารางที่ 4.1 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่วัดได้จากเครื่องวัดสารพันธุกรรม

ลำดับที่	ชนิด	ความยาวคลื่นแสง (นาโนเมตร)			ปริมาณดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)
		260	280	260/280	
1	<i>I. lacei</i>	0.524	0.300	1.75	26.18
2	<i>I. hendecaphylla</i> var. <i>hendecaphylla</i>	1.369	0.742	1.84	68.43
3	<i>I. caloneura</i> 1	0.486	0.273	1.78	24.28
4	<i>I. caloneura</i> 2	0.560	0.306	1.83	28.02
5	<i>I. sootepensis</i>	0.982	0.540	1.82	49.08
6	<i>I. dosua</i>	1.695	0.916	1.85	84.74
7	<i>I. emmae</i>	0.751	0.416	1.80	37.53
8	<i>I. linnaei</i>	0.977	0.522	1.87	48.84
9	<i>I. hirsuta</i>	0.763	0.422	1.81	38.14

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับเบสในบริเวณ ITS และคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลคราม

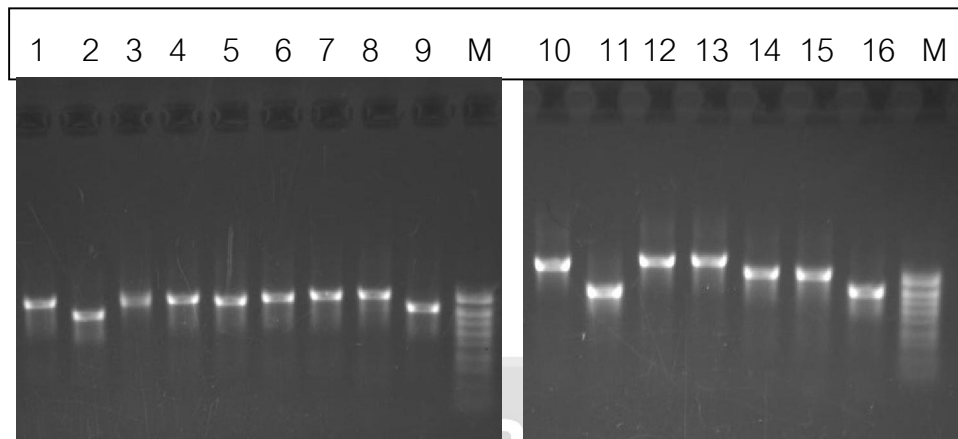
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับเบสในส่วนของ ITS คือ ไพรเมอร์ ITS4-ITS5 และดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม ด้วยการใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ คือ trnLC-trnLF, rpL16F71-rpL16R1516, psbA-trnH, trnS^{UGA}-trnM^{CAU}, rpS162F2-trnK^{UUU},

trnD^{GUC}-trnE^{UUC}, trnT^{GGU}-trnY^{GUA} และ trnL-rpL132 ของพืชสกุลครามและพืชในกลุ่มจำนวน 10 ชนิด 12 ตัวอย่าง คือ *I. lacei*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. caloneura* 1, *I. caloneura* 2, *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae*, *I. linnaei*, *I. hirsuta*, *I. spicata* Forssk (Hawaii1), *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) และ *Clitoria* sp. เมื่อตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ ITS4-ITS5 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลครามในส่วนของ ITS ได้ ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลคราม พบว่าไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ trnS^{UGA}-trnM^{CAU} และ rps162F2-trnK^{UUU} ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ได้ ส่วนไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ คือ ไพรเมอร์ trnLC-trnLF, rpL16F71-rpL16R1516, psbA-trnH, trnD^{GUC}-trnE^{UUC}, trnT^{GGU}-trnY^{GUA} และ trnL-rpL132 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ได้ จากนั้นเมื่อนำผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นไปหาลำดับเบส พบว่าลำดับเบสที่ได้จากส่วนของ ITS ของพืชสกุลครามมีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามสูง และไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ คือไพรเมอร์ rpL16F71-rpL16R1516, psbA-trnH และ trnL-rpL132 สามารถระบุความแตกต่างและความผันแปรทางพันธุกรรมในส่วนคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามได้ดี ดังภาพที่ 4.2-4.8 ดังนั้นจึงนำลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์พันธุกรรมในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์ไปสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม



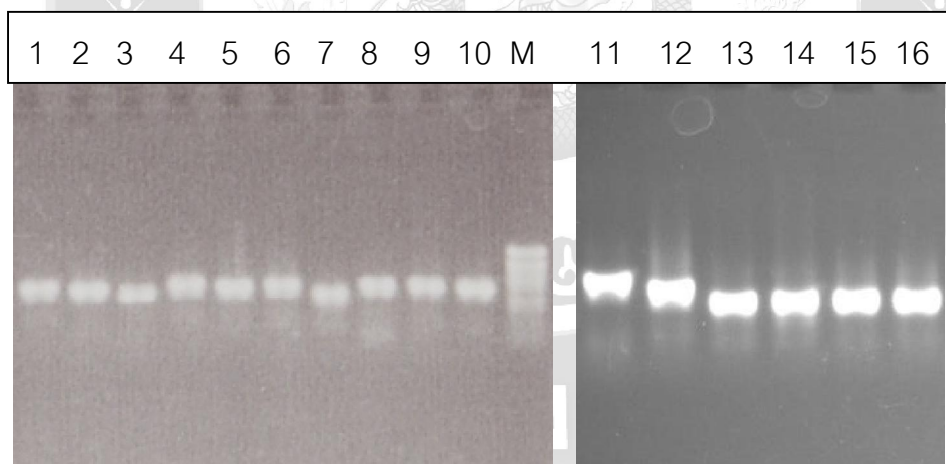
ภาพที่ 4.2 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของ ITS ที่ได้จากไพรเมอร์ ITS4-ITS5

M=DNA marker, 1=*I. lacei*, 2= *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, 3=*I. caloneura* 1, 4= *Phyllanthus* sp., 5= *I. sootepensis*, 6= *I. dosua*, 7= *I. emmae*, 8=*I. linnaei*, 9= *I. hirsuta*, 10= *I. caloneura* 2, 11=tomato (positive control) 12= *I. spicata* Forssk (Hawaii1), 13= *I. spicata* Forssk (Hawaii2), 14= *Phyllanthus* sp. 15= *Phyllanthus* sp. และ 16= *Clitoria* sp.



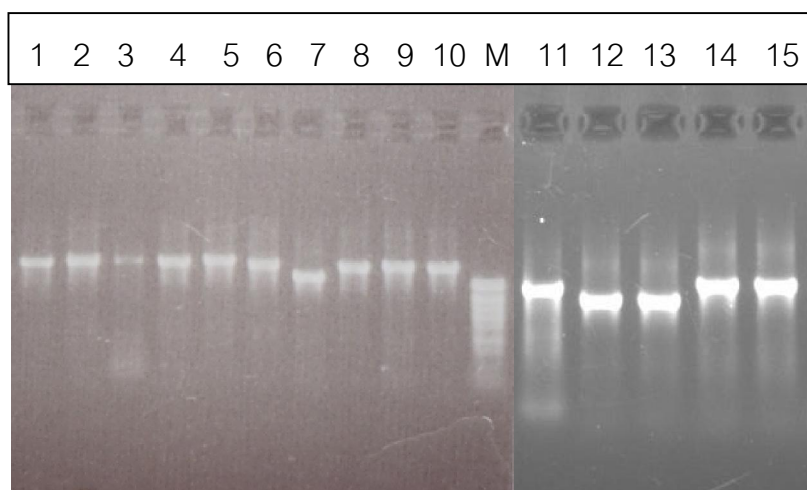
ภาพที่ 4.3 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์ที่ได้จากไพรเมอร์ trnL-rpL132

M=DNA marker, 1= *I. caloneura* 2, 2= *I. hirsuta*, 3=*I. linnaei*, 4= *I. emmae*, 5= *I. dosua*, 6= *I. sootepensis*, 7=*I. caloneura* 1, 8= *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, 9=*I. lacei*, 10=tomato (positive control) 11= *Clitoria* sp. 12 = *Phyllanthus* sp. 1, 13= *Phyllanthus* sp.2 14= *I. spicata* Forssk (Hawaii2), 15= *I. spicata* Forssk (Hawaii) และ 16= *I. hirsuta*

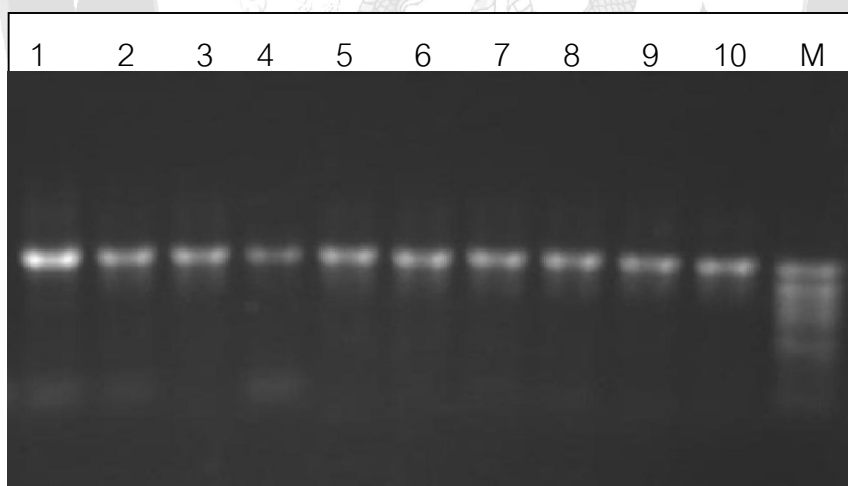


ภาพที่ 4.4 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ psbA-trnH

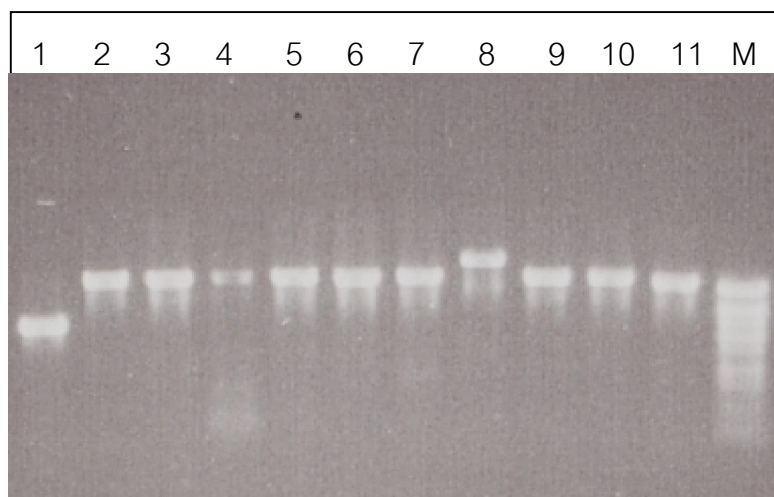
M=DNA marker, 1= *I. caloneura* 2, 2= *I. hirsuta*, 3=*I. linnaei*, 4= *I. emmae*, 5= *I. dosua*, 6= *I. sootepensis*, 7== *Phyllanthus* sp.8= *I. caloneura* 1, 9= *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, 10=*I. lacei*, 11=tomato (positive control) 12= *Clitoria* sp. 13 = *Phyllanthus* sp. 1, 14= *Phyllanthus* sp.2 15= *I. spicata* Forssk (Hawaii2), 16= *I. spicata* Forssk (Hawaii)



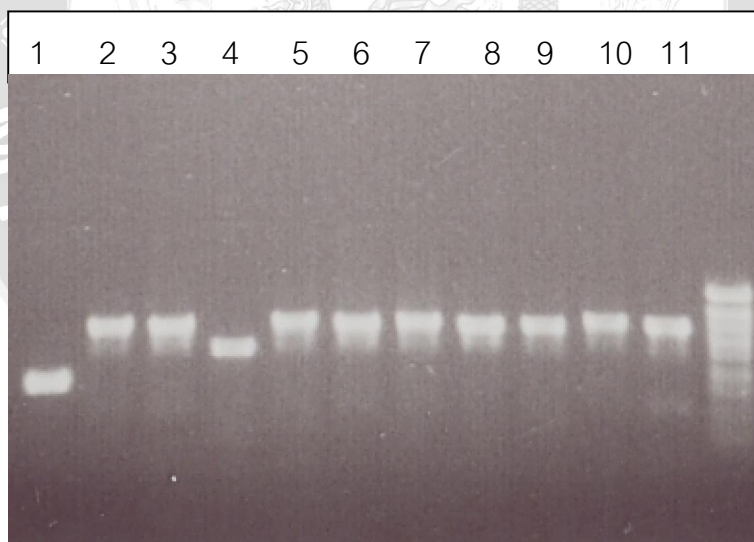
ภาพที่ 4.5 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ rpL16F71-rpL16R1516
M=DNA marker, 1= *I. caloneura* 2, 2= *I. hirsuta*, 3=*I. linnaei*, 4= *I. emmae*, 5= *I. dosua*,
6= *I. sootepensis*, 7== *Phylanthus* sp.8= *I. caloneura* 1, 9= *I. hendecaphylla* var.
hendecaphylla, 10=*I. lacei*, 11= *Clitoria* sp. 12 = *Phylanthus* sp. 1, 13= *Phylanthus* sp.2
14= *I. spicata* Forssk (Hawaii2), 15= *I. spicata* Forssk (Hawaii1)



ภาพที่ 4.6 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ trnI C_trnI F
M=DNA marker, 1= *I. caloneura* 2, 2= *I. hirsuta*, 3=*I. linnaei*, 4= *I. emmae*, 5= *I. dosua*,
6= *I. sootepensis*, 7== *Phylanthus* sp.8= *I. caloneura* 1, 9= *I. hendecaphylla* var.
hendecaphylla, 10=*I. lacei*



ภาพที่ 4.7 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ trnT^{GGU} - trnY^{GUA}
 M=DNA marker, 1= tomato (positive control) 1= *I. caloneura* 2, 2= *I. hirsuta*, 3=*I. linnaei*,
 4= *I. emmae*, 5= *I. dosua*, 6= *I. sootepensis*, 7== *Phylanthus* sp.8= *I. caloneura* 1, 9= *I.*
hendecaphylla var. *hendecaphylla*, 10=*I. lacei*



ภาพที่ 4.8 ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ trnD^{GUC} - trnE^{UUC}
 M=DNA marker, 1= tomato (positive control) 1= *I. caloneura* 2, 2= *I. hirsuta*, 3=*I. linnaei*,
 4= *I. emmae*, 5= *I. dosua*, 6= *I. sootepensis*, 7== *Phylanthus* sp.8= *I. caloneura* 1, 9= *I.*
hendecaphylla var. *hendecaphylla*, 10=*I. lacei*

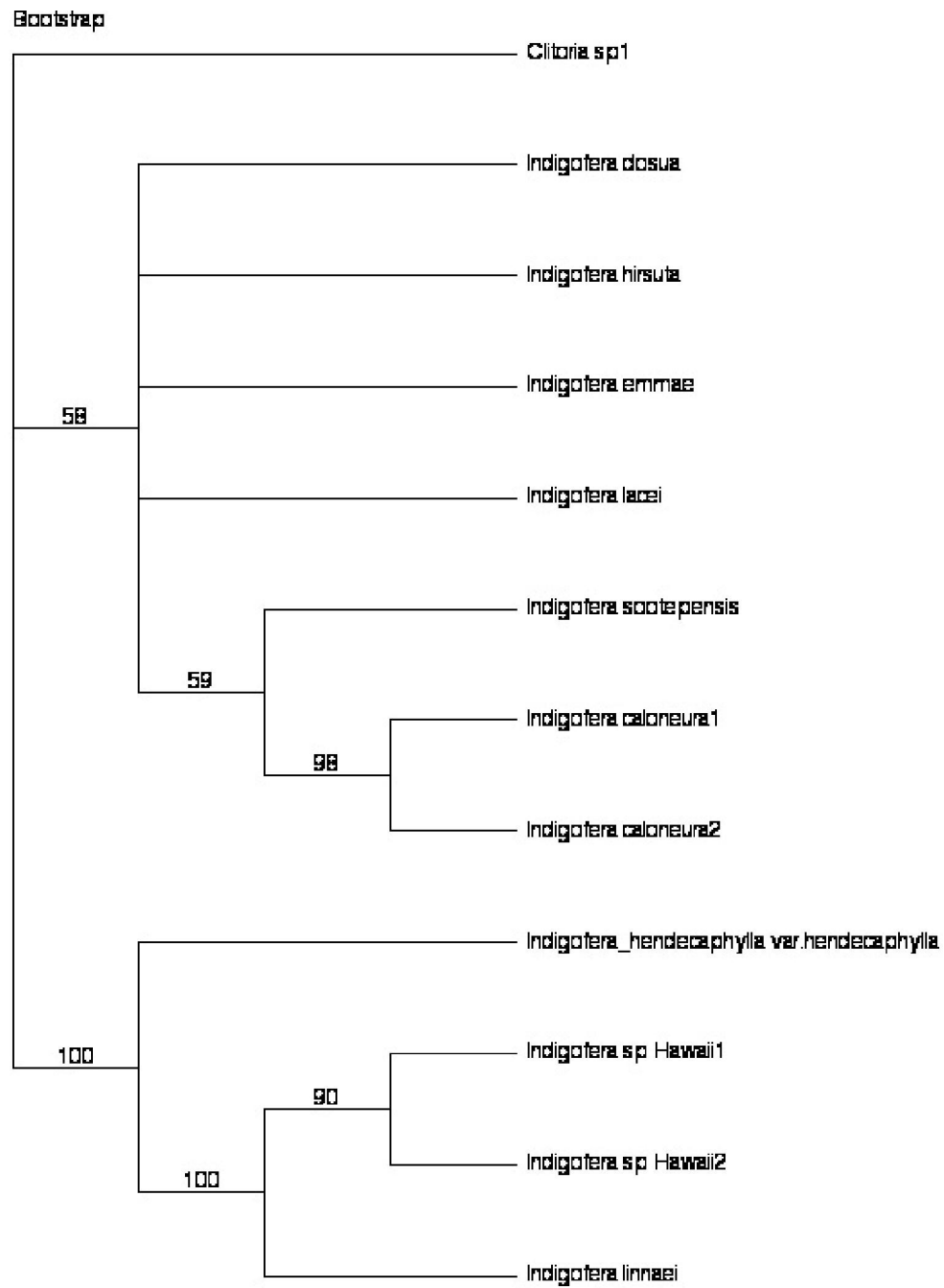
4.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน ITS และคลอโรพลาสต์

จากการนำลำดับเบสของส่วน ITS และดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามมาสร้าง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดโดยการนำลำดับเบสในแต่ละคู่ไพรเมอร์มาสร้าง ความสัมพันธ์ พบว่าเดนไดรแกรมในส่วนของลำดับเบสของ ITS ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ ITS4_ITS5 แบ่ง พืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอก กลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 4 ชนิด คือ *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 6 ชนิด 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. lacei*, *I. caloneura* 1, *I. caloneura* 2, *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* และ *I. hirsuta* ดังภาพที่ 4.9

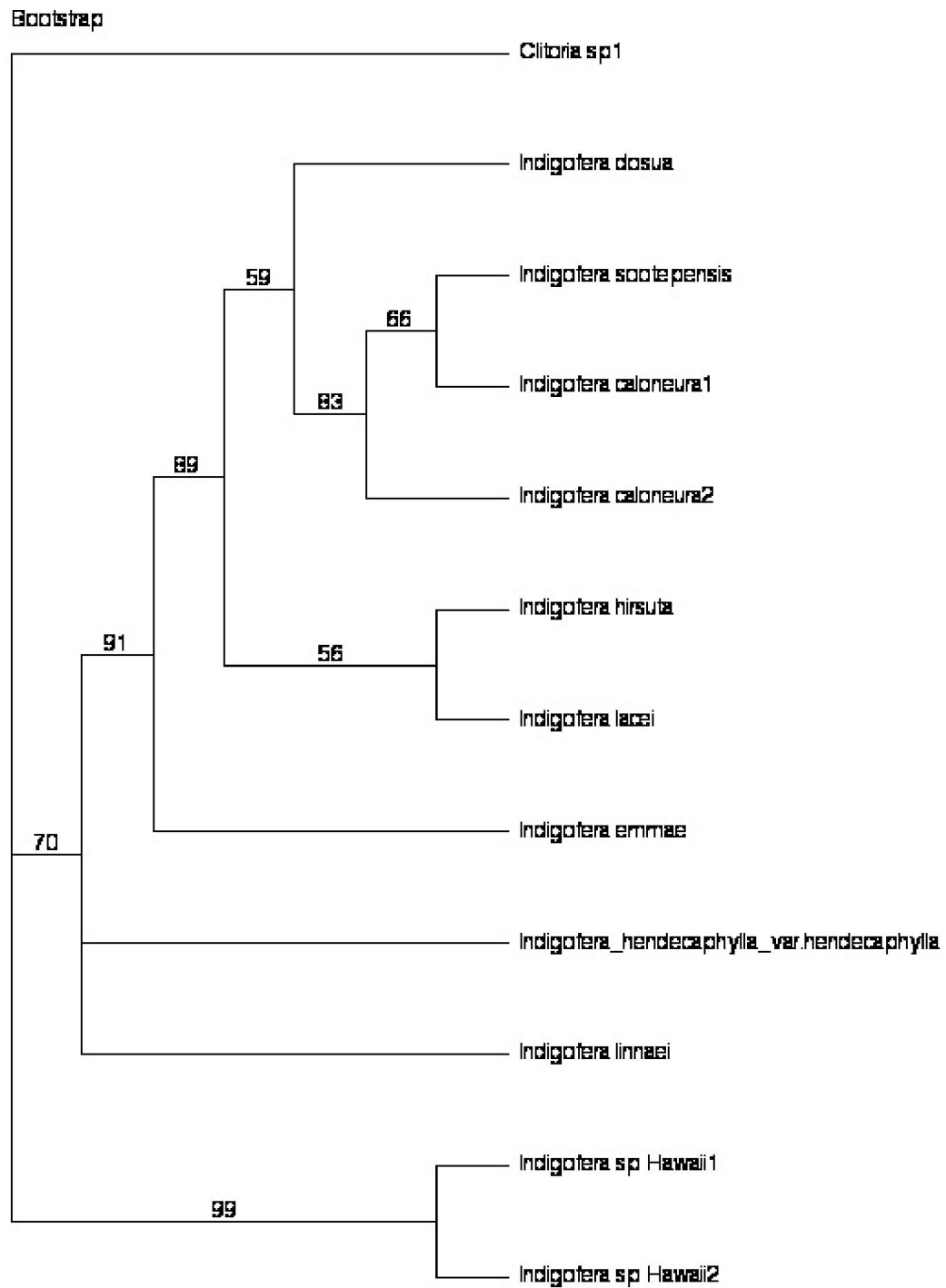
เดนไดรแกรมที่ได้จากไพรเมอร์ในคู่ของ psbA_trnH สามารถแบ่งพืชสกุลครามและพืช นอกกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 2 ชนิด คือ *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 8 ชนิด 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. lacei*, *I. caloneura* 1, *I. caloneura* 2, *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* และ *I. hirsuta* ดังภาพที่ 4.10

เดนไดรแกรมที่ได้จากไพรเมอร์ในคู่ของ rpl16F71-rpl16R1516 สามารถแบ่งพืชสกุลคราม และพืชนอกกลุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 1 ชนิด คือ *I. hirsuta* กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 4 ชนิด 5 ตัวอย่าง คือ *I. dosua*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 4 ชนิด 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. lacei*, *I. caloneura* 1, *I. caloneura* 2, *I. sootepensis*, , *I. emmae* และ ดังภาพที่ 4.11

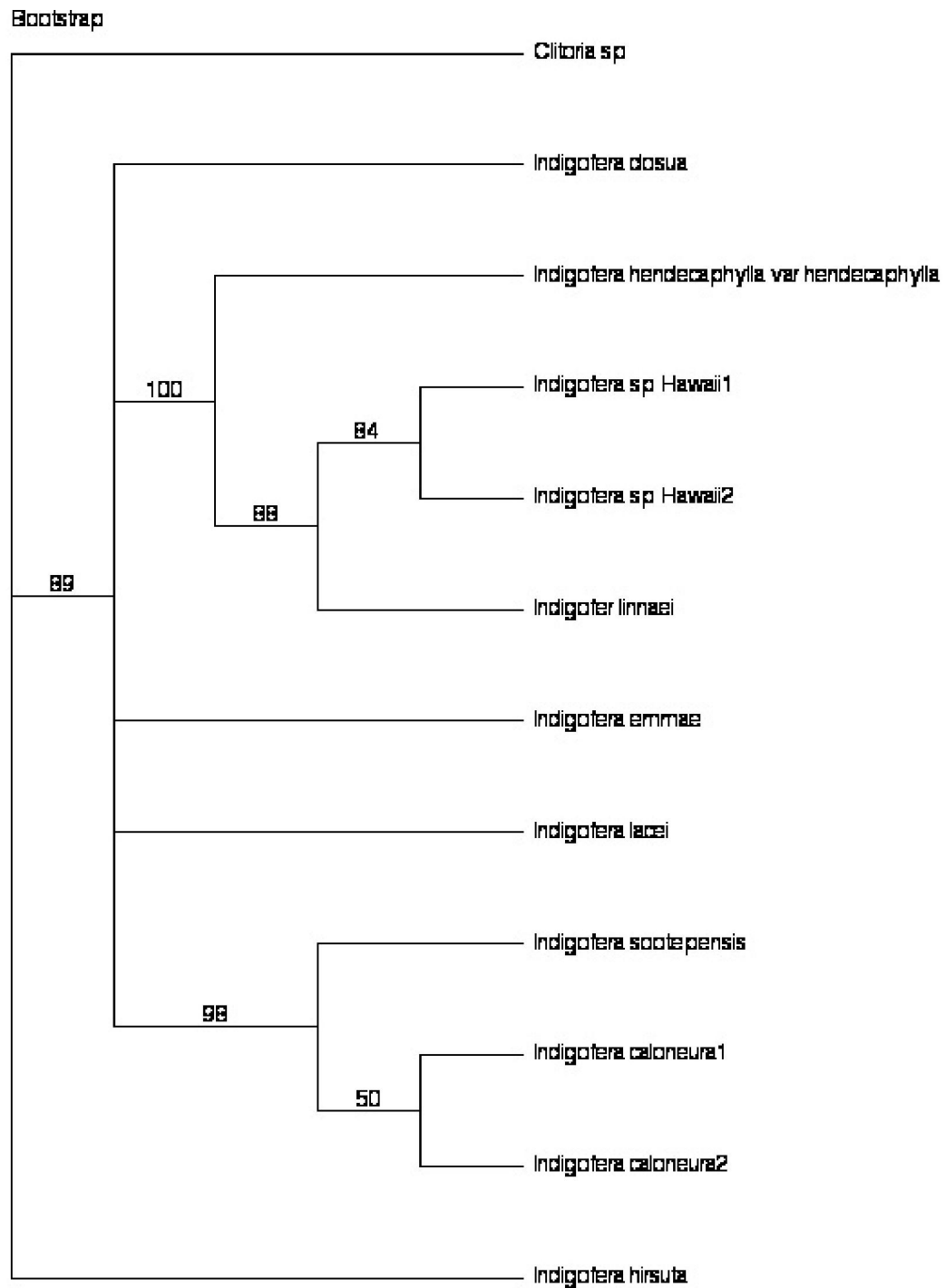
เดนไดรแกรมที่ได้จากไพรเมอร์ในคู่ของ trnL_rpl132 สามารถแบ่งพืชสกุลครามและพืชนอก กลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 2 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. และ *I. dosua* กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 8 ชนิด 10 ตัวอย่าง คือ *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2), *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. lacei*, *I. caloneura* 1, *I. caloneura* 2, *I. sootepensis*, , *I. emmae* และ *I. hirsuta* ดังภาพที่ 4.12



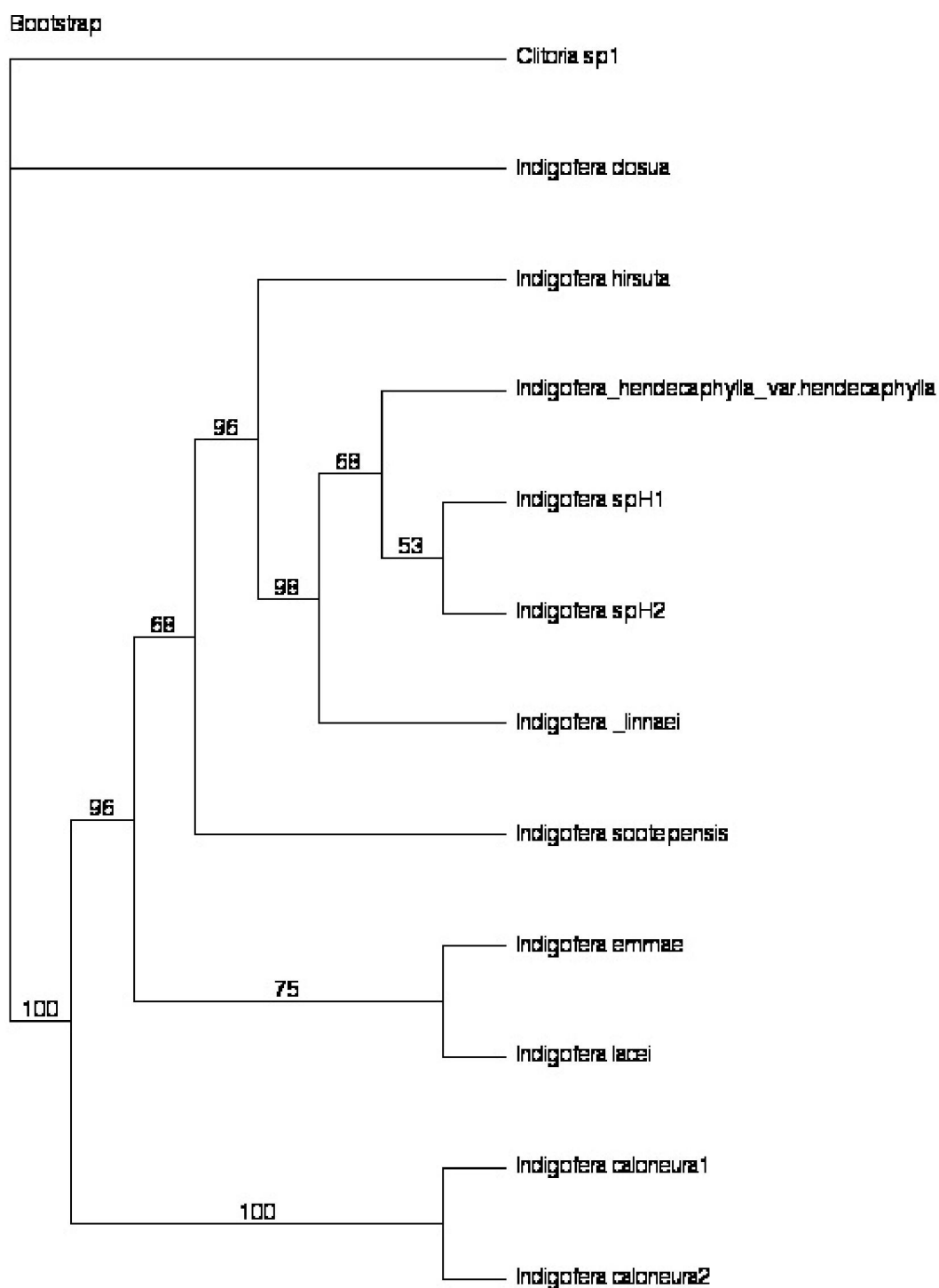
ภาพที่ 4.9 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่ได้จากลำดับเบสในบริเวณ ITS ของไพรเมอร์ ITS4 ITS5



ภาพที่ 4.10 เดนไดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่ได้จากลำดับเบสในบริเวณคลอโรพลาสต์ ของไพรเมอร์ psbA_trnH

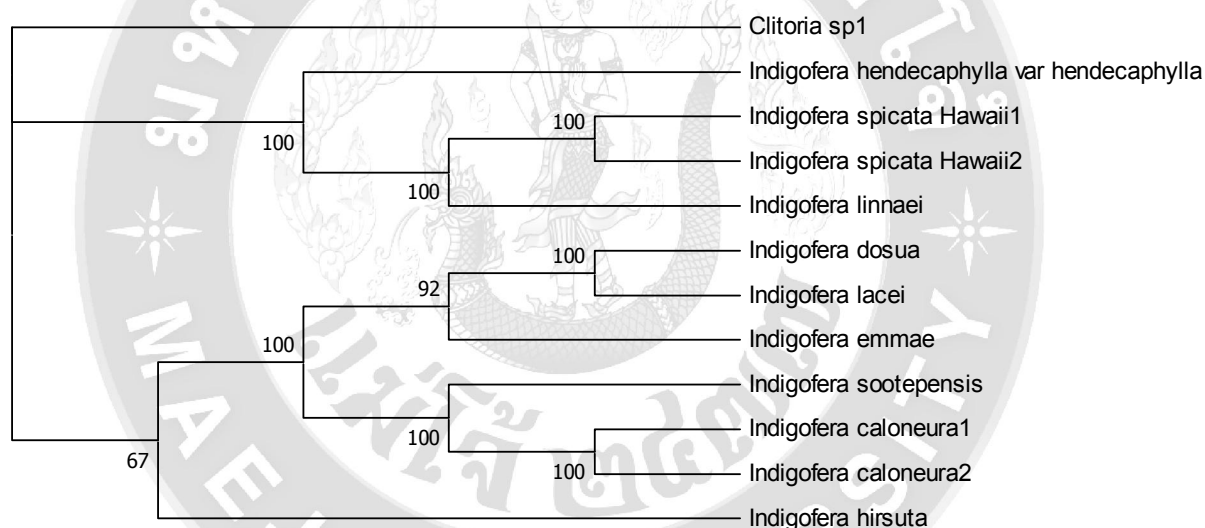


ภาพที่ 4.11 เดนไดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่ได้จากลำดับเบสในบริเวณคลอโรพลาสต์ ของไพรเมอร์ rpL16F71-rpL16R1516



ภาพที่ 4.12 เดนไดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามที่ได้จาก
ลำดับเบสในบริเวณคลอโรพลาสต์ ของไพรเมอร์ trnL_rpL132

จากนั้นเมื่อนำลำดับเบสในดีเอ็นเอทั้งในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลคราม และพืชนอกกลุ่มมาสร้างเดนโดรแกรม เพื่อหาเดนโดรแกรมที่สามารถบอกความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมระหว่างชนิดของพืชสกุลครามจำนวน 9 ชนิด 11 ตัวอย่าง และพืชนอกกลุ่ม ผลการ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของ พืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 3 ชนิด 4 ตัวอย่าง คือ *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) และกลุ่มที่ 3 มีจำนวน 6 ชนิด 7 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* และ *I. hirsuta* ดังภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม ที่ได้จากลำดับเบสในบริเวณส่วน ITS และคลอโรพลาสต์

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 สันฐานวิทยาของพืชสกุลคราม

จากการเก็บรวบรวมข้อมูลสันฐานวิทยาจากรายงานการวิจัยของ สว. มัธฐา (2550) พบว่า ลักษณะทางสันฐานวิทยาของพืชสกุลครามจำนวน 8 ชนิด 9 ตัวอย่าง มีลักษณะสันฐานวิทยาหลายประการที่คล้ายคลึงกัน เช่น เป็นไม้พุ่มสูงและมีใบประกอบเรียงแบบสลับ มีหูใบรูปสามเหลี่ยมถึงสามเหลี่ยมแคบ เช่น *I. lacei*, *I. caloneura*, *I. sootepensis*, *I. emmae*, *I. dosua* และ *I. hirsuta* นอกจากนี้พืชสกุลครามหลายชนิดเป็นไม้ทอดเลื้อยและมีใบประกอบเรียงแบบสลับใบย่อยมี 5-11 ใบ เรียงแบบสลับ กลีบเลี้ยงมีหลอดกลีบรูปถ้วย กลีบดอกมีสีชมพู เช่น *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) Xinfen and Schrire (2010) รายงานว่าพืชสกุลครามมีลักษณะเป็นพืชกลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลายชนิด โดยพบว่าประกอบไปด้วยไม้ล้มลุกหลายปี หรือไม้ทอดเลื้อย ไม้พุ่มขนาดเล็ก หรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ลำต้นมีขนปรากฏ ที่พบได้ทั้งในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนกระจายไปทั่วโลก อย่างไรก็ตามปัจจัยของสภาพแวดล้อมที่เหมือนกันไม่ว่าจะเป็นลักษณะพื้นที่ แร่ธาตุอาหาร และความอุดมสมบูรณ์ของพื้นดิน สภาพอากาศอุณหภูมิที่เท่ากันจึงส่งผลทำให้พืชสกุลครามมีลักษณะทางสันฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Bennett et al. (2008) ว่าความหลากหลายทางสันฐานวิทยาขึ้นอยู่กับพื้นที่และธรรมชาติที่อยู่บริเวณนั้นจะทำให้เกิดความแตกต่างทางสายพันธุ์มาก อรุณรัตน์ ฉวีราช (2547) รายงานว่าปัจจัยทางสภาพแวดล้อมมีบทบาทสำคัญที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกพืช และบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชได้ อย่างไรก็ตาม นันทวรรณ คนะวาปี (2550) ได้กล่าวว่าปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมและสันฐานวิทยาไม่ได้มีผลต่อความผันแปรทางพันธุกรรม เพราะพันธุกรรมมีสภาพความคงตัวสูง จึงส่งผลให้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ดังนั้นการศึกษาดีเอ็นเอจึงสามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ดีที่สุด

จากผลการวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าลักษณะสันฐานวิทยาของพืชสกุลครามที่แตกต่างกันไปในนั้นขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง มีสภาพอากาศ และ สภาพแวดล้อมที่พืชอาศัยอยู่แตกต่างกัน หรืออาจมีการกลายพันธุ์หรือเกิดการผสมข้ามชนิดหรือสายพันธุ์ ซึ่งอาจจะเป็นการปรับตัวของพืชสกุลครามให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในบริเวณนั้นจึงก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ทางด้านลักษณะภายนอก หรืออาจเป็นไปได้ว่าเป็นส้อมสายพันธุ์เดียวกัน แต่ลักษณะภายในยังคงเดิม เหมือน ว่าความหลากหลายทาง

ต้นฐานฐานวิทยาขึ้นอยู่กับพื้นที่และธรรมชาติที่อยู่บริเวณนั้นจะทำให้เกิดความแตกต่างทางสายพันธุ์ และก็ได้อีกว่าปัจจัยทางสภาพแวดล้อมมีบทบาทสำคัญที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกพืชและบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชได้

5.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม

จากการสกัดดีเอ็นเอพืชสกุลครามจำนวน 8 ชนิด 9 ตัวอย่าง คือ *I. lacei*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae*, *I. linnaei*, *I. hirsuta* ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Dneasy Plant Mini Kits เมื่อนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดสารพันธุกรรมปริมาณน้อย ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างแห้งของพืชสกุลครามมีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์ โดยมีค่าความบริสุทธิ์ ของดีเอ็นเอ (อัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร) อยู่ระหว่าง 1.75-1.87 ซึ่งสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และคณะ (2544) รายงานว่าการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ จำเป็นต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงทั้งของดีเอ็นเอ (OD_{260}) และโปรตีน (OD_{280}) คุณภาพของดีเอ็นเอจากอัตราส่วนของค่า OD_{260}/OD_{280} ถ้าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ จะมีค่าอัตราส่วนเท่ากับ 1.8-2.0 ถ้ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือสารเคมีในกระบวนการสกัดดีเอ็นเออัตราส่วนจะต่ำกว่า 1.6 แต่ถ้ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเออัตราส่วนจะมีค่ามากกว่า 2.0

ในส่วนของคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชสกุลครามพบว่าปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 24.28 – 84.74 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งในพืชสกุลครามชนิด *I. caloneura* 1 มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ 24.28 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และพืชสกุลครามชนิด *I. dosua* มีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดที่ 84.74 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอในครั้งนี้เป็นการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อใบอ่อน จึงทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์ ที่ผ่านมามีรายงานว่าสิ่งจำเป็นที่ควรคำนึงถึงในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช คือ อายุของเนื้อเยื่อตัวอย่างพืชที่นำมาสกัดควรใช้ใบอ่อนที่มีอายุน้อย และอยู่ในระยะการเจริญเติบโต เนื่องจากเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อยประกอบด้วยเซลล์ที่มีอัตราการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นสูง มีจำนวนเซลล์มาก และมีการสะสมของสารประกอบพวกโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิกอยู่น้อย ทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากและคุณภาพดี (Shaw, 1988; Staub *et al.*, 1996) Ozdemir *et al.* (2002) รายงานว่าเนื้อเยื่อของใบอ่อนที่นำมาสกัดดีเอ็นเอควรมีอายุไม่เกิน 2 สัปดาห์หลังจาก หรือการนำตัวอย่างพืชที่ปลูกในบริเวณที่มีความ

เข้มของแสงต่ำมาสังกัดดีเอ็นเอ จะช่วยลดส่วนประกอบจำพวกแป้งในตัวอย่างพืชที่ศึกษาได้ เนื่องจากความเข้มของแสงมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง คือ ทำให้โฟตอน (photon) ทำหน้าที่ดูดกลืนแสงได้น้อยลง ส่งผลต่อปฏิกิริยาการใช้แสง (light reaction) สร้างสาร NADPH และ ATP ที่ใช้ในปฏิกิริยาไม่ใช้แสง (dark reaction) ได้ต่ำลง ส่งผลให้เกิดการผลิตสารจำพวกแป้งได้น้อยลง และความเข้มแสงยังจำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์บางตัวที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงอีกด้วย (Owens, 1996) ส่วนความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลครามที่สังกัดได้ อาจเกิดเนื่องจากใบของพืชสกุลครามมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันของใบ ทำให้บางชนิดสามารถสังกัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณที่มาก เช่น พืชสกุลครามชนิด *I. dosua* สามารถสังกัดดีเอ็นเอได้มากที่สุดที่ 84.74 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เนื่องจากลักษณะของใบอ่อนพืชสกุลครามชนิดนี้มีความหนาของใบมาก และอาจจะมีจำนวนเซลล์หนาแน่นมากกว่าใบอ่อนของพืชสกุลครามชนิดอื่นๆ ดังนั้นเมื่อสังกัดดีเอ็นเอออกมาจึงได้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าพืชสกุลครามชนิดอื่นๆ

5.3 การเพิ่มปริมาณและการหาลำดับเบสดีเอ็นเอในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับเบสในส่วนของ ITS คือ ไพรเมอร์ ITS4-5 และดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม ด้วยการใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ คือ trnLC_trnLF, rpL16F71-rpL16R1516, psbA-trnH, trnS^{UGA}-trnM^{CAU}, rpS162F2-trnK^{UUU}, trnD^{GUC}-trnE^{UUC}, trnT^{GGU}-trnY^{GUA} และ trnL-rpL132 ของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มจำนวน 10 ชนิด 12 ตัวอย่าง คือ *I. lacei*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae*, *I. linnaei*, *I. hirsuta*, *I. spicata* Forssk (Hawaii1), *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) และ *Clitoria* sp. เมื่อตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ ITS4-ITS5 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลครามในส่วนของ ITS ได้ และลำดับเบสในส่วนของ ITS สามารถใช้ในการจำแนกและระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของพืชสกุลครามได้ดี Hu et al. (2002) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในเผ่า Millettieae (Fabaceae) ในส่วนของลำดับเบสใน ITS/5.8S บ่งชี้ได้ว่าพืชในเผ่า Millettieae แบ่งออกเป็นหลายกลุ่มย่อย และข้อมูลลำดับเบสในส่วนของ ITS ยังเป็นช่วยสนับสนุนความถูกต้องของแต่ละกลุ่มย่อยของพืชในเผ่า Millettieae นอกจากนี้ Choi and Kim (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลครามจากลำดับเบสในส่วน internal transcribed spacer (ITS1), ITS2 และ 5.8s rDNA เพื่อบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลครามจำนวน 6 ชนิด ทั้งที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์ โดยพบว่าลำดับ

เบสในส่วนของ ITS1 มีความยาวอยู่ในช่วงระหว่าง 230-240 คู่เบส (based pair: bp) ITS2 มีความยาวอยู่ระหว่าง 211-213 คู่เบส ส่วนลำดับเบสในส่วนของ 5.8S rRNA มีความยาวของเบสทั้งหมด 161 คู่เบส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลคราม พบว่าไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ trnS^{UGA} - trnM^{CAU} และ rps16F2 - trnK^{UUU} ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ได้ เพราะลำดับเบสของไพรเมอร์ไม่เป็นเบสคู่สมกับลำดับเบสในจีโนมของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ได้ ส่วนไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ คือ ไพรเมอร์ trnLC - trnLF , rpl16F71 - rpl16R1516 , psbA - trnH , trnD^{GUC} - trnE^{UUC} , trnT^{GGU} - trnY^{GUA} และ trnL - rpl132 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามได้ เพราะมีตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่เป็นเบสคู่สมกับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มได้ ทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับตำแหน่งของเบสบนสายดีเอ็นเอแม่แบบได้ใน 2 ทิศทางตรงข้ามกัน จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ขึ้นมา (Tengy and Tufo, 1993, Waugh and Powell, 1992) จากนั้นเมื่อนำผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นไปหาลำดับเบส พบว่าลำดับเบสที่ได้จากส่วนของ ITS ของพืชสกุลครามมีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามสูง และไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ คือไพรเมอร์ rpl16F71 - rpl16R1516 , psbA - trnH และ trnL - rpl132 สามารถระบุความแตกต่างและความผันแปรทางพันธุกรรมในส่วนดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามได้ดี Shaw et al. (2007) รายงานว่าคู่ไพรเมอร์ trnL - rpl132 สามารถระบุความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับเบสในส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามได้ ซึ่งทำให้สามารถที่จะนำไปใช้ในการจัดจำแนกชนิดของพืชสกุลคราม ในขณะที่ลำดับเบสในคลอโรพลาสต์ที่ได้จากไพรเมอร์ trnLC - trnLF , trnD^{GUC} - trnE^{UUC} , trnT^{GGU} - trnY^{GUA} พบว่าลำดับเบสมีความผันแปรทางพันธุกรรมน้อย ซึ่งสอดคล้องกับ สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล และคณะ (2544) ได้กล่าวไว้ว่าดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสต์เป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่ถูกถ่ายทอดจากแม่ (maternal inheritant) ซึ่งจะพบมากในพืช และมีความผันแปรน้อยในแง่ของขนาด โครงสร้างจำนวน และการเรียงลำดับของยีนในดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสต์มีความแตกต่างระหว่างชนิดมากขึ้น จึงสามารถนำมาใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชที่ต่ำกว่าชนิดได้ Shaw et al. (2005) กล่าวว่าลำดับเบสของดีเอ็นเอในบริเวณ non-coding sequence ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกพืช บ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และกระบวนการวิวัฒนาการของพืชได้ดี อย่างไรก็ตามลำดับเบสในส่วนของคลอโรพลาสต์จะต้องเพิ่ม

ปริมาณในตำแหน่งที่เหมาะสมของคู่ไพรเมอร์ จึงจะสามารถระบุความผันแปรและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชได้ถูกต้อง โดยจากการใช้ลำดับเบสในส่วนของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ที่เพิ่มปริมาณมาจากไพรเมอร์ trnL_trnF และ trnK_matK ในพืชสกุลคราม พบว่าสามารถระบุความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามได้ดี

5.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน ITS และคลอโรพลาสต์

จากเดนโดรแกรมในส่วนของลำดับเบสของ ITS ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ ITS4 ITS5 แบ่งพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 4 ชนิด คือ *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 6 ชนิด 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* และ *I. hirsuta* ดังภาพที่ ในคู่ไพรเมอร์ psbA_trnH สามารถแบ่งพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 2 ชนิด คือ *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 8 ชนิด 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* และ *I. hirsuta* คู่ไพรเมอร์ rpL16F71-rpL16R1516 สามารถแบ่งพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 1 ชนิด คือ *I. hirsuta* กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 4 ชนิด 5 ตัวอย่าง คือ *I. dosua*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 4 ชนิด 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. emmae* และ คู่ไพรเมอร์ใน trnL-rpL132 สามารถแบ่งพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 2 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. และ *I. dosua* กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 8 ชนิด 10 ตัวอย่าง คือ *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2), *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. emmae* และ *I. hirsuta* และเดนโดรแกรมของการนำลำดับเบสในดีเอ็นเอทั้งในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มมาสร้างเดนโดรแกรม แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 3 ชนิด 4 ตัวอย่าง คือ *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I.*

spicata Forssk (Hawaii1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) และกลุ่มที่ 3 มีจำนวน 6 ชนิด 7 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* และ *I. hirsuta* Choi and Kim (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลครามจากลำดับเบสในส่วน internal transcribed spacer (ITS1), ITS2 และ 5.8s rDNA เพื่อบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลครามจำนวน 6 ชนิด ทั้งที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์ โดยพบว่าเดนไดรแกรม *I. kirilowii* ($2n=2x=16$) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืชที่เป็นบรรพบุรุษ (common ancestor) มากที่สุด ส่วน *I. decora* ($2n=6x=48$), *I. venulosa*, *I. granddiflora* ($2n=2x=16$) และ *I. koreana* ($2n=4x=32$) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับพืชบรรพบุรุษที่ห่างออกไป ซึ่งบ่งชี้ถึงกระบวนการวิวัฒนาการว่าพืชสกุลครามที่เป็นชนิดโพลีพลอยด์มีวิวัฒนาการสูงกว่าที่เป็นดิพลอยด์ Marazzi et al. (2006) ได้จัดกลุ่มพืชสกุล *Senna* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ถั่วเหมือนกับพืชสกุลครามด้วยวิธี Parsimony โดยใช้ดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสต์จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ *rpS16*, *rpL16* และ *matK* พบว่าเดนไดรแกรมที่ได้ช่วยสนับสนุนการจัดกลุ่มของพืชสกุล *Senna* ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น Hu et al. (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในเผ่า Millettieae วงศ์ Leguminosae โดยใช้ลำดับเบสที่อยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์จากไพรเมอร์ *trnK-matK* พบว่าเดนไดรแกรมที่ได้สามารถใช้ในการจัดจำแนกพืชในเผ่า Millettieae นอกจากนี้ยังมีค่า Bootstrap สูงอีกด้วย

Mcdade and Moody (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Acanthaceae จากลำดับเบสดีเอ็นเอส่วนของ intron และ spacer ของยีน *trnL-trnF* ที่สกัดจากคลอโรพลาสต์ พบว่าลำดับเบสในส่วน of intron และ spacer ของยีน *trnL-trnF* มีความคล้ายคลึงในประชากรที่เป็นสกุลเดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันในประชากรต่างสกุลกัน และยังบ่งชี้ว่าพืชสกุลต่างๆ ที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพืชในสกุล *Eritraria* มากกว่าพืชสกุล *Thumbergia* และ *Mendoncia* ตามลำดับ และสามารถแบ่งกลุ่มของพืชวงศ์ Acanthaceae ออกเป็น 4 กลุ่มที่สำคัญ คือ *Acanthus*, *Barleria*, *Ruellia* และ *Justicia* ต่อมา Moylan et al. (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลฮ่อมจากลำดับเบสดีเอ็นเอของส่วน internal transcribed spacer nuclear DNA (ITS nrDNA) ที่แยกจากนิวเคลียส และ *trnL-trnF* ที่แยกจากคลอโรพลาสต์ พบว่าลำดับเบสดีเอ็นเอ *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ แยกเผ่าย่อย Strobilanthisae ออกเป็นหนึ่งกลุ่มใหญ่ และไม่สามารถแยกเผ่าย่อย Strobilanthisae ออกเป็นแต่ละสกุลได้ ในขณะที่ลำดับเบส ดีเอ็นเอของส่วน ITS nrDNA ที่แยกได้จากนิวเคลียสสามารถแยกเผ่าย่อย Strobilanthisae ออกเป็น 3 สกุล คือ *Hemigraphis*, *Sericocalyx* และ *Strobilanthes*

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

6.1 สันฐานวิทยาของพืชสกุลคราม

จากการเก็บรวบรวมข้อมูลสันฐานวิทยาของพืชสกุลครามจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *I. lacei*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. caloneura*, *I. sootepensis*, *I. emmae*, *I. linnaei*, *I. hirsuta* และ *I. dosua* จากข้อมูลงานวิจัยของ สว. มัธฐา (2550) ลักษณะของพืชสกุลครามโดยส่วนใหญ่จะเป็นไม้พุ่ม หรือไม้ทอดเลื้อย ขนเป็นรูปอักษรตัวที (T-shaped) แบบมีแขนยาวเท่ากัน หรือเกือบเท่ากัน ใบเป็นใบเดี่ยว หรือใบประกอบแบบขนนกมี 1 ถึงหลายใบย่อย ขนเป็นรูปอักษรตัวที แบบมีแขนยาวเท่ากัน หรือเกือบเท่ากัน มีหูใบรูปสามเหลี่ยมถึงสามเหลี่ยมแคบ กลีบเลี้ยงมีหลอดกลีบรูปถ้วย กลีบดอกมีสีชมพูเข้มหรือสีขาว

6.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของพืชสกุลครามด้วยน้ำยาสำเร็จรูป

จากการสกัดดีเอ็นเอพืชสกุลครามจำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Dneasy Plant Mini Kits เมื่อนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างแห้งของพืชสกุลครามมีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์ โดยมีค่าความบริสุทธิ์ (อัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร) อยู่ระหว่าง 1.75-1.87 และปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณระหว่าง 24.28 – 84.74 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งในพืชสกุลครามชนิด *I. caloneura* (1) มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ 24.28 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และพืชสกุลครามชนิด *I. dosua* มีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดที่ 84.74 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

6.3 การเพิ่มปริมาณและการหาลำดับเบสดีเอ็นเอในส่วนของ ITS และคลอโรพลาสต์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับเบสในส่วนของ ITS คือ ไพรเมอร์ ITS4-ITS5 และดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่ม ด้วยการใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ คือ trnLC-trnLF, rpL16F71-rpL16R1516, psbA-trnH, trnS^{UGA}-trnM^{CAU}, rpS162F2-trnK^{UUU}, trnD^{GUC}-trnE^{UUC}, trnT^{GGU}-trnY^{GUA} และ trnL-rpL132 ของพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มจำนวน 10 ชนิด 12 ตัวอย่าง คือ *I. lacei*, *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae*, *I. linnaei*, *I. hirsuta*, *I. spicata* Forssk (Hawaii 1), *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) และ *Clitoria* sp. เมื่อตรวจสอบผลด้วย 1% agarose

gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ ITS4-ITS5 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลครามในส่วนของ ITS ได้ ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลคราม พบว่าไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ trnS^{UGA}-trnM^{CAU} และ rps16F2-trnK^{UUU} ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ได้ ส่วนไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ คือ ไพรเมอร์ trnLC-trnLF, rpL16F71-rpL16R1516, psbA-trnH, trnD^{GUC}-trnE^{UUC}, trnT^{GGU}-trnY^{GUA} และ trnL-rpL132 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ได้ จากนั้นเมื่อนำผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นไปหาลำดับเบส พบว่าลำดับเบสที่ได้จากส่วนของ ITS ของพืชสกุลครามมีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามสูง และไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ คือไพรเมอร์ rpL16F71-rpL16R1516, psbA-trnH และ trnL-rpL132 สามารถระบุความแตกต่างและความผันแปรทางพันธุกรรมในส่วนดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของพืชสกุลครามได้ดี

6.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน ITS และคลอโรพลาสต์

เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับเบสของ ITS ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ ITS4_5 และจากลำดับเบสของ ITS และลำดับเบสของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์สามารถแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เหมือนกัน คือสามารถแบ่งชนิดพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 4 ชนิด คือ *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 6 ชนิด 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* และ *I. hirsuta* ส่วนเดนโดรแกรมที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ psbA-trnH สามารถแบ่งพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม เช่นเดียวกัน ซึ่งแต่ละมีจำนวนชนิดของพืชสกุลครามอยู่ในกลุ่มที่แตกต่างกันคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยจำนวน 1 ชนิด คือ พืชนอกกลุ่ม *Clitoria* sp. กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 2 ชนิด คือ *I. spicata* Forssk (Hawaii 1) และ *I. spicata* Forssk (Hawaii 2) กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 8 ชนิด 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *I. hendecaphylla* var. *hendecaphylla*, *I. linnaei*, *I. lacei*, *I. caloneura* (1), *I. caloneura* (2), *I. sootepensis*, *I. dosua*, *I. emmae* และ *I. hirsuta* ในขณะที่เดนโดรแกรมที่ได้จากไพรเมอร์ในคู่ของ rpL16F71-rpL16R1516 และ trnL-rpL132 สามารถแบ่งพืชสกุลครามและพืชนอกกลุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม และ 2 กลุ่ม ตามลำดับ แต่ละกลุ่มก็ประกอบด้วยจำนวนของชนิดที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามลำดับเบสในส่วนของ ITS เป็นบริเวณที่สามารถใช้ในการบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามได้ดี

6.5 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามให้ครอบคลุมทั่วทั้งประเทศไทย เพราะประเทศมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้มาก นอกจากนี้ในการสร้างเดนโรแกรมควรที่จะมีการนำข้อมูลทางสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ ข้อมูลในระดับพันธุกรรมที่อยู่ในนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ เพื่อข้อมูลที่ได้จะได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น



บรรณานุกรม

- จรัส ลิลิตวงศ์. 2542. **พืชวงศ์ย่อยประดู่ (Papilionoideae) ในอุทยานแห่งชาติภูพาน**
จ.สกลนคร. ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2547. **วงศ์วานวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล (Molecular Phylogenetics)**
อนุกรมวิธาน ระบบวิทยา และวงศ์วานวิวัฒนาการ. จุลสารพันธุศาสตร์. 24(1):18-23.
- เต็ม สิมิตินันท์. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.** ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้
กรมป่าไม้.
- นันทวรรณ คณะวาปี. 2550. **เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการระบุพืชสกุล *Phyllanthus* L.**
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปรีชา ประเทพา. 2551. **การวิจัยยีนแนวคิดและกระบวนการวิจัยในเชิงประชากร.**
พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาสารคาม: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- สไว มัฐผา. 2550. **อนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์ของพืชสกุลคราม (วงศ์ถั่ว) ในประเทศ**
ไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, สงกรานต์ จิตราการ, พจนา วีระโสภณ, หทัยรัตน์ อุไรวงศ์, วิภา หงส์ตระกูล
และ นันทฤดี จวบสมัย. 2544. **เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการการ**
ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP. ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี.**
ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม**
สมิตินันท์. พิมพ์ครั้งที่ 2 (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม) บริษัทประชาชน จำกัด. กรุงเทพฯ:
- อรุณรัตน์ ฉวีราช. 2547. **Plant Taxonomy and Cladistics.** พิมพ์ครั้งที่ 1 ขอนแก่น:
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Archak, S. 2000. Plant DNA fingerprinting: an overview. *AgBiotechNet*. 2: 1-6.
- Bennett, R. J., Woo, R. I. J. and Scotland, W. R. 2008. Uncorrelated variation in
widespread species: species delimitation in *Strobilanthes echinata* Nees
(Acanthaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 156(7): 131 -141.

- Craib, W.G. 1913. The Indigoferas of China. **Notes Royal Botanic Gardens and Edinburgh** 36: 47-77.
- Choi, B.H. and Kim, J.H. 1997. ITS sequence and speciation on Far Eastern *Indigofera* (Leguminosae). **Journal of Plant Research**. 110: 339-346.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**. 32: 1792-1797.
- Frahm-Leliveld. 1966. Cytotaxonomic notes on the genera *Indigofera* L. and *Cyamopsis* DC. **Genetica**. 37(1): 403-426.
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E.M., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G. and Meijer, L. 1999. Indiburin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. **Nature Cell Biology**. 1: 60-67.
- Hu, J.H., Lavin M., Wojciecowski, M.F. and Sanderson, M.J. 2000. Phylogenetic systematic of the Tribe Millettieae (Leguminosae) base on chloroplast trnK/matK sequences and its implications for evolutionary patterns in Papilionoideae. **American Journal of Botany**. 87(3): 418-430.
- Hu, J.H., Lavin, M., Wojciecowski, M.F. and Sanderson, M.J. 2002. Phylogenetic Analysis of nuclear ribosomal ITS/5.8S sequences in the Tribe Millettieae (Fabaceae): Poecilanthe-Cyclolobium, the core Millettieae, and the Callerya group. **Systematic Botany**. 27(4): 722-733.
- Jahan, B., Vahidy, A.A. and Ali, S.I. 1994. Chromosome numbers in some taxa of Fabaceae mostly native to Pakistan. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 81(4): 792-799.
- Kumar S. Tamura K. and Nei M. 2004. MEGA3: An integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefing in Bioinformatics**. 5: 150-163.
- Mcdade, L.A. and Moody, M.L. 1999. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from noncoding trnL-trnF Chloroplast DNA sequences. **American Journal of Botany**. 86(1): 70-80.

- Marazzi B., Endress P.K., De Queiroz L.P. and Conti E. 2006. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: Patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. **American Journal of Botany**. 93(2): 288-303.
- Moylan, E.C., Bennett, J.R., Carine, M.A., Olmstead, R.G. and Scotland, W. 2004. Phylogenetic relationships among *Strobilanthes* S.L. (Acanthaceae): evidence from ITS nrDNA, trnL-F cpDNA and Morphology. **American Journal of Botany**. 91(5): 724-735.
- Narender, T., Khaliq, T., Puri, A. and Chander, R. 2006. Antidyslipidemic activity of furano-flavonoids isolated from *Indigofera tinctoria*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 16: 3411-3414.
- Nwachukwu, C.U. and Edeoga, H.O. 2006. Palynomorphology of some species of *Indigofera* L. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 9(10): 1940-1944.
- Ozdemir, M., Horn, R. and Fried, W. 2002. Isolation of HMV DNA from sunflower (*Helianthus annuus* L.) For BAC cloning. **Plant Molecular Biology Reporter**. 20: 239-250.
- Owens, T. G. 1996. Processing of excitation energy by antenna pigments. In: **Photosynthesis and the environment**. Baker, N. R., (eds.), pp. 1-23. Kluwer Academic Publishers. London.
- Rambaut A. 1996. Se-Al: Sequence Alignment Editor (Se-Al v2.0a11). Available Source: <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>. March 30, 2009.
- Schrire B.D., Lavin M., Barker N.P. and Forest F. 2009. Phylogeny of the tribe Indigofereae (Leguminosae-Papilionoideae): Geographically structured more in succulent-rich and temperate settings than in grass-rich environments. **American Journal of Botany**. 96(4): 816-852.
- Shaw, C. H. 1988. **Plant molecular biology: a practical approach**. IRL Press, Oxford.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., and Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**.

94(3): 275-288.

Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E., and Small, R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis.

American Journal of Botany. 92(1): 142-166.

Siva, R. 2007. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. **Current Science.** 92(7): 916-925.

Swofford, D.L. 2002. **PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)**, version 4.0b10. Sinauer Press, Sunderland, Massachusetts.

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

Staub, J., Bacher, J. and Poetter, K. 1996. Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in Cucumber. **HortScience.** 31(2): 262-266.

Tingey, S. V. and Tufo, J. P. D. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Physiology.** 101: 349-352.

Waugh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. **Trends in Biotechnology.** 10: 186-191.

White, T.J., Bruns, T., Lee S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: **A guide to methods and applications.** M. Innics, D. Gelfand J. Sninsky and T.J. white (Eds.), pp. 315-322. Academic Press, San diego.

Xinfen, G. and Schrire, D.S. 2010. Indigofera Linnaeus. **Flora of China.** 10:137-164.



ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

1.1 การเตรียม 1 % (w/v) agarose gel

agarose	0.8	กรัม
1X TBE	80	มิลลิลิตร

ละลาย agarose ใน 1X TBE buffer ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ละลายเจลด้วยไมโครเวฟ แล้วนำไปผ่านน้ำพอกุ่น เติมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วอะการอสลงในภาตเจลแล้วเสียบหัว 20 รอนเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที

1.2 การเตรียม 1X loading buffer

0.25% bromophenol blue	0.041	กรัม
0.25% xylene cyanol FF	0.041	กรัม
30% glycerol	500	ไมโครลิตร

ละลายสารละลายต่างๆ ตามลำดับให้เข้ากัน

1.3 การเตรียม 1M EDTA

EDTA	372.24	กรัม
------	--------	------

ชั่งสารละลาย EDTA แล้วละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปรับ pH ด้วย NaOH จนได้ pH 8.0