# ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora*
# Genetic Diversity in *Passiflora* spp.

**อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม**[1]*, **สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม**[1] **และ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ**[2]
Anurug Poeaim[1]*, Supattar Poeaim[1] and Tassnart Krajangvuthi[2]
[1]*สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520;*
[2]*พระตำหนักสวนปทุม ปทุมธานี12000*
[1]*Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520;* [2] *Phra Tamnak Suan Pathum, Pathumthani 12000*
**Corresponding author: kpanurug@kmitl.ac.th*

## บทคัดย่อ

พืชสกุล *Passiflora* เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora* โดยศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาในส่วนของใบ และเทคนิคทางโมเลกุล จากพืชสกุล *Passiflora* ที่รวบรวมจากต่างประเทศในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี จำนวน 17 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ในประเทศจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ กะทกรก (*P. foetida*) และเสาวรส (*P. edulis var. flavicarpa*) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาในส่วนของใบมีความแตกต่างกัน สามารถแบ่งกลุ่มตามรูปร่างของใบได้ 4 กลุ่ม สำหรับเทคนิคทางโมเลกุล ศึกษาด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ที่อยู่บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 Passiflora/ ITS2 Passiflora พบว่าทุกตัวอย่างมีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 650 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมกับตัวอย่างที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม PHYLIP เพื่อหาแผนภูมิความสัมพันธ์โดยวิธี Neighbour-Joining แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในระดับสปีชีส์สูง สามารถจำแนกความแตกต่างออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบ โดย *P. edulis* และ *P. foetida* รวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

## ABSTRACT

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

**คำสำคัญ**: สกุล *Passiflora*, ความหลากหลายทางพันธุกรรม
**Keywords**: *Passiflora* spp., genetic diversity

## บทนำ

พืชในสกุล *Passiflora* มีชื่อทั่วไปว่า passion fruit เช่น *P. edulis f. flavicarpa* และ *P. edulis* ที่นำมารับประทานผลสุกและทำน้ำผลไม้ และสายพันธุ์ที่ให้ดอกสวยงาม นิยมเรียก passion flower เช่น *P. incarnate* ในประเทศไทยมีทั้งที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมและนำเข้า และจากพืชสกุลนี้มีความหลากหลายสูง จึงมีชื่อและการให้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่หลากหลายเช่นกัน เช่น กระทกรก (*P. foetida*), เสาวรส (*P. laurifolia* และ *P. edulis*), ค้างคาว (*P. lunata*), เสาวรสใต้ (*P. perakensis*), สุคนธรส (*P. quadrangularis*), เสาวรสสยาม (*P. siamica*), ลิ้นมังกร (*P. vitifolia*) และเสาวรสขม (*P. wilsonii*) เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันพืชในสกุล *Passiflora* มีความสำคัญทั้งในแง่คุณค่าทางอาหารและเป็นพืชเศรษฐกิจ มีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยจำนวนมาก ซึ่งการศึกษาความหลากหลายจะช่วยให้การจัดจำแนกพืชในสกุล *Passiflora* มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ รวมทั้งเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Passiflora* จากพื้นที่ต่างๆ และสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

## อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเก็บตัวอย่าง**

เก็บตัวอย่างใบของพืชในสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ต่าง ๆ จากแปลงเกษตรทดลองส่วนพระองค์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ. พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี โดยตัวอย่างที่เก็บจะเป็นพืชสกุล *Passiflora* สายพันธุ์ที่รวบรวมมาจากต่างประเทศ และสายพันธุ์พื้นบ้าน บันทึกรายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยาเฉพาะลักษณะของใบ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกสายพันธุ์

2. **การสกัดดีเอ็นเอ**

นำตัวอย่างใบมาทำความสะอาดโดยล้างน้ำสะอาด ตัดส่วนเส้นกลางและก้านใบทิ้ง นำมาบดโดยไนโตรเจนเหลว และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis) โดยใช้วิธีการตามคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอ นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของดีเอ็นเอ และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. **การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ**

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 Passiflora (5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3') และไพรเมอร์ ITS2 Passiflora (5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3') (Desfeux และ Lejeune, 1996) โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.8 พิโคโมล ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้น initiation denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส ทำให้ PCR product บริสุทธิ์ และนำไปศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ต่อไป

4. **การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม**

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และนำตัวอย่าง ได้แก่ AY 632705 *P. biflora*, DQ 238787 *P. coriacea*, EU 258423 *P. organensis* และ EU 258456 *P. tricuspis* โดยนำ AY 632713 *P. mexicana* มาใช้เป็น outgroup และวิเคราะห์หา phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยโปรแกรม Phylip package วิเคราะห์ข้อมูลค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) โดยใช้ Kimura 2-parameter model หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี Neighbor-joining

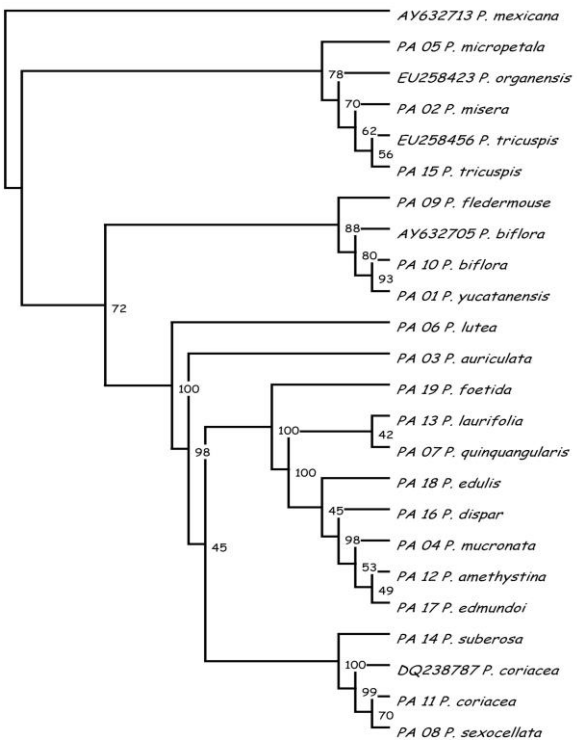
## ผลการทดลองและวิจารณ์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ พบว่าใบเป็นใบเดี่ยว มีการจัดเรียงตัวของใบบนลำต้นเป็นแบบสลับ รูปร่างของใบมีหลากหลายลักษณะ โดยส่วนใหญ่มีลักษณะแบบใบกว้าง ปลายใบมีทั้งปลายใบแหลมเป็นติ่งแหลม การเว้าตื้น การเว้าบุ๋ม ลักษณะขอบใบมีการเว้าหยักเช่นกัน มีทั้งขอบใบหยักเว้า และหยักลึก และมีทั้งโคนใบมน และโคนใบรูปหัวใจ รวมทั้งมีต่อมบนใบ สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** การจัดจำแนกตัวอย่างพืชสกุล *Passiflora* ตามลักษณะรูปร่างของใบ

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

ในเทคนิค PCR เฉพาะคู่ไพรเมอร์ ITS1 Passiflora/ITS2 Passiflora ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ที่ annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยผลิตภัณฑ์มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสร้าง phylogenetic tree พบว่า AY632713 *P. mexicana* ที่นำมาเป็น outgroup แยกออกจากกลุ่มตัวอย่างอย่างชัดเจน และสามารถจำแนกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม ดังรูปที่ 1 โดยพบว่า *P. edulis* (PA 18) หรือเสาวรส และ *P. foetida* (PA 19) หรือกะทกรก มีลักษณะของใบอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จัดทั้ง 2 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบ แต่อย่างไรก็ตาม Viana และคณะ (2510) พบว่าเทคนิค RAPD สามารถแบ่งกลุ่มได้ชัดเจนกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา




**รูปที่** 1 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora*

## สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความหลากหลายของพืชสกุล *Passiflora* ที่รวบรวมในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี จำนวน 17 ตัวอย่าง ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในส่วนของใบ และเทคนิคทางโมเลกุล พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับชนิด (species) สูง และมีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูงมากกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบ

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง งบรายได้ประจำปี 2554

## เอกสารอ้างอิง

Desfeux C, Lejeune B. Systematics of Euromediterranean Silene (Caryophyllaceae): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequence. Comptes Renduts, Academie des Sciences, Paris. 1996. 319: 351-358.

Viana AJC, Souza MM, Araujo IS, Correa RX, Ahnert D. Genetic diversity in *Passiflora* species determined by morphological and molecular characteristics. Biologia Plantarum. 2010; 54: 535-538.