ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของพืชสกุลไก่แดงบางชนิดในประเทศไทย

นางสาว ปองทิพย์ ใจดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 947-53-1449-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR GENETIC RELATIONSHIP OF SOME *Aeschynanthus* IN THAILAND

Miss Pongtip Jaidee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1449-8

Thesis Title	Molecular Genetic Relationship of some Aeschynanthus in Thailand
By	Miss Pongtip Jaidee
Field of study	Genetics
Thesis Advisor	Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Jessada Denduangboripant, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

..... Dean of Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Nantana Angkinand ..... Chairman

(Associate Professor Nantana Angkinand)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.)

Jessada Denduangboripant ..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Jessada Denduangboripant, Ph.D.)

Sumitra Kongchuensin ..... Member

(Associate Professor Sumitra Kongchuensin)

..... Member

(Piyasak Chaumpluk , Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปองทิพย์ ใจดี : ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของพืชสกุลไก่แดงบางชนิดในประเทศไทย (MOLECULAR PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF SOME *Aeschynanthus* IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์ 188 หน้า. ISBN 974-53-1449-8.

พืชสกุลไก่แดง *(Aeschynanthus)* เป็นสกุลของพืชอิงอาศัย มีประมาณ 160 ชนิด กระจายทั่วไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีดอกทรงหลอดสีแดงหรือเหลืองสด ดังนั้นจึงมีการปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ จากการศึกษาเอกสารและตัวอย่างแห้งพบว่า มีอยู่ประมาณ 20 ชนิดในประเทศไทย พืชเหล่านี้ส่วนใหญ่ยังไม่เคยได้รับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ทั้งระดับเซลล์และโมเลกุล ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลไก่แดง โดยเน้นไปที่ลำดับดีเอ็นเอบริเวณไอทีเอสของยีนนิวเคลียร์ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เริ่มจากการรวบรวมตัวอย่างต้นไก่แดงจากการออกสำรวจเก็บตัวอย่างพืช การซื้อจากตลาดขายต้นไม้ และการขอตัวอย่างจากองค์กรต่างประเทศ ดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชที่ถูกสกัดและเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ก่อนที่จะหาลำดับเบสและจัดเรียงเทียบกับข้อมูลเดิมของพืชสกุลไก่แดงเพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการขึ้นมาใหม่ ผลที่ได้ยืนยันการแบ่งพืชสกุลไก่แดงออกเป็นสองกลุ่มย่อย ต้นไก่แดงในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ขณะที่เฉพาะ *A. radicans* และ *A. parvifolius* จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 สำหรับ *A. andersonii*, *A. humilis* และ *A. hildebrandi* ซึ่งเป็นสามชนิดที่อาจมีปัญหาเรื่องชื่อซ้ำซ้อนกันนั้น จากการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลและเทคนิคพีซีอาร์อาร์เอพีดี พบว่า *A. andersonii* และ *A. humilis* ควรเป็นชนิดเดียวกัน ตัวอย่างพืชที่เพิ่มเข้าไปใหม่เกือบทั้งหมดที่มีชื่อเดียวกันแต่ต่างเลขประจำตัวกับคู่ของมันที่เคยศึกษามาก่อน จะจับกลุ่มอยู่ด้วยกัน การขาดข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาของต้นไก่แดงหลายชนิดได้จำกัดการอภิปรายถึงรูปแบบการเกิดวิวัฒนาการของเมล็ดของมัน วิทยานิพนธ์นี้ยังได้ใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการระบุชื่อชนิดของต้นไก่แดงทั้งที่เป็นพืชปลูก และพืชตามธรรมชาติได้สำเร็จ เป็นที่น่าสนใจว่าตัวอย่างพืชไก่แดงต้นหนึ่งซึ่งมีดอกสีชมพูแปลกไปจากปรกตินั้น มีลำดับดีเอ็นเอบริเวณไอทีเอสที่เฉพาะตัวและอาจจะเป็นพืชชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยถูกรายงานมาก่อน นอกจากนี้การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของพืชสกุลไก่แดงหกชนิด แสดงให้เห็นว่าโครโมโซมของพืชเหล่านี้มีขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถจัดเรียงรูปแบบของโครโมโซมได้ *A. radicans*, *A. obconicus* และ *A.* sp. JJ_001 มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 32 ส่วน *A. andersonii*, *A. humilis* และ *A. hildebrandii* มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 28 การศึกษาจำนวนโครโมโซมในครั้งนี้ได้ช่วยสนับสนุนการจัด *A. andersonii*, *A. humilis* และ *A. hildebrandii* ให้อยู่ในหมู่ *X* ตามสัณฐานวิทยาของเมล็ดและความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุล

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....ปองทิพย์ ใจดี.....

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....Warat Chulalaksananukul.....

ปีการศึกษา.....2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์.....

4572376423 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: *Aeschynanthus* / Genetic relationship / Molecular phylogenetics / ITS / Thailand

PONGTIP JAIDEE : MOLECULAR GENETIC RELATIONSHIP OF SOME *Aeschynanthus* IN THAILAND. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D, THESIS COADVISOR : ASSIT. PROF. JESSADA DENDUANGBORIPANT, Ph.D 188 pp. ISBN 974-53-1449-8.

Aeschynanthus is an epiphyte genus with c.160 species wide spreading in SE Asia. They have brightly red or orange tubular flowers and therefore are commercially cultivated. Literature reviews and herbarium visiting indicated that there are approximately 20 species in Thailand. Most of these plants have not yet been studied in both cellular and molecular genetics. Thus this thesis had studied genetic relationship of *Aeschynanthus* especially on sequences of ITS regions of nuclear ribosomal DNA gene. First, plant sample collections were done by having an expedition, buying from a plant market, and asking from foreign organisation. DNA of the plant specimens were extracted and ITS regions were amplified with PCR before sequenced and aligned with a previously data to reconstruct a phylogenetic tree. The result confirms a division of *Aeschynanthus* into two major groups. Most of Thai species were placed in the clade I while only *A. radicans* and *A. parvifolius* were in the clade II. *Aeschynanthus andersonii*, *A. humilis* and *A. hildebrandii*, the three supposingly synonymous species, were found from molecular phylogenetic and PCR-RAPD studies that *A. andersonii* and *A. humilis* should be the same species. Almost all additional samples having the same name but different in accession number to their investigated counterparts were clustered together. Lacks of morphological information of some *Aeschynanthus* species limited a discussion on their seed evolutionary patterns. This thesis also used molecular techniques to identify cultivated and wild samples successfully. Interestingly, one species with unusual pink flowers showed unique ITS sequence and may be a new undescribed species. Furthermore, a cytogenetic investigation of six *Aeschynanthus* species indicated that chromosomes of these plants were too small to do karyotyping. *Aeschynanthus radicans*, *A. obconicus* and *A.* sp. JJ_001 have chromosome numbers of 2n= 32 whereas *A. andersonii*, *A. humilis* and *A. hildebrandii* have 2n=28. This chromosome number counting supports the suggestion to place *A. andersonii*, *A. humilis*, *A. hildebrandii* into the section *X*.

Department.....Botany.....Student's signature.....Pongtip Jaidee.....

Field of study.....Genetics.....Advisor's signature.....Warawut Chulalaksananukul.....

Academic year.....2004.....Co-advisor's signature.....Jessada Denduangboripant.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor and co-advisor, Assoc. Prof. Dr. Warawut Chulalaksananukul and Assit. Prof. Dr. Jessada Denduangboripant, for their valuable advice, guidance, encouragement, and support throughout this thesis. My gratitude is extended to Assoc. Prof. Nantana Angkinand, Assoc. Prof. Sumitra Kongchuensin and Dr. Piyasak Chaumpluk for serving as thesis committee. This work was particially supported by the Graduate School fund of Chulalongkorn University. I also thank all staff of Department of Botany and Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their support.

This investigation was made possible by extensive living collection of Royal Botanic Garden Edingburgh (RBGE) and in the memory of Mary Mendum who provided all RBGE *Aeschynanthus* leaf samples and valuable comments in this study. I also deeply thank Dr. Michael Moeller of RBGE for *Aeschynanthus* root samples, discussion and critical comments.

Moreover, I am grateful to Mrs. Pranee Palee of Chiangmai University herbarium for her help on expedition and photographs of *Aeschynanthus* samples, and also Mr. Yuttaya Yuyen of Chiangmai University for helping on growing *Aeschynanthus* roots. I sincerely thank very much to all of my MSc friends especially to Miss Virginia Chalermchigit for her warm relationship throughout my study. Finally, the greatest indebtedness is expressed to my family for cheer-up, supportive, and endless love.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....x

LIST OF FIGURES.....xi

ABBREVIATIONS.....xiii

CHAPTER I: INTRODUCTION..... 1

Research objective 4

CHAPTER II: BACKGROUND

2.1 The genus *Aeschynanthus*

2.1.1 Characteristics of the genus *Aeschynanthus* 5

2.1.2 Taxonomy of *Aeschynanthus* 8

2.1.3 Cytological study of the genus *Aeschynanthus* 18

2.1.4 *Aeschynanthus* in Thailand 19

2.2 Plant molecular phylogenetics

2.2.1 Principle of molecular phylogenetics 29

2.2.2 Molecular techniques for phylogenetic study in plants

2.2.2.1 PCR amplification on gene target 32

2.2.2.2 DNA sequencing 35

2.2.2.3 PCR–RAPD 36

2.2.3 Plant nuclear ribosomal DNA, its ITS region, and their uses

2.2.3.1 Plant nuclear ribosomal DNA 37

2.2.3.2 Phylogenetic implications from nuclear ribosomal DNA 40

2.2.3.3 The use of ITS regions in plant phylogenetics studies 41

2.2.4 Phylogenetic tree reconstruction methods

2.2.4.1 DNA Data matrix preparation 42

Page

2.2.4.2 Maximum parsimony and Neighbour-joining 42
2.2.4.3 Tree rooting and consensus tree analyses 45
2.2.4.4 Tree evaluation 47
2.3 The use of molecular phylogenetics
2.3.1 Using molecular phylogenetics to study plant systematics and evolution 49
2.3.2 Molecular identification 50
CHAPTER III: MATERIALS AND METHODS
3.1 Materials
3.1.1 Plant materials 53
3.1.2 Equipments 57
3.1.3 Chemicals 59
3.1.4 Oligonucleotide primers 61
3.2 Molecular phylogenetic experiments
3.2.1 DNA extraction 61
3.2.2 Agarose gel electrophoresis 62
3.2.3 PCR Amplification 63
3.2.4 PCR-RAPD amplification of ITS regions 64
3.2.5 Purification of the PCR products 65
3.2.6 DNA cycle sequencing 66
3.2.7 Phylogenetic analyses 67
3.3 Cytogenetic experiment
3.3.1 Root preparation and collection 70
3.3.2 Chromosome staining and counting 71
CHAPTER IV: RESULTS
4.1 Plant materials
4.1.1 Collection of *Aeschynanthus* cultivars from Jatujak market 73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

4.1.2 Expedition in Chiangmai to collect wild *Aeschynanthus* samples 76
4.2 DNA extraction 82
4.3 PCR amplification of ITS regions 84
4.4 PCR product purification and DNA sequencing 87
4.5 DNA data matrix preparation 90
4.6 Phylogenetic analyses
4.6.1 Analyses of the ITS data matrix of *Aeschynanthus* samples supplied from RBGE 112
4.6.2 Analyses of the ITS data matrix of *Aeschynanthus* samples bought from Jatujak market 121
4.6.3 Analyses of the ITS data matrix of *Aeschynanthus* collected in Chiangmai 126
4.7 PCR RAPD experiments 128
4.8 Cytogenetic experiments 130
CHAPTER V: DISCUSSION
5.1 Molecular phylogenetic analyses of Thai *Aeschynanthus* and implication for *Aeschynanthus* taxonomy 139
5.2 Morphological and cytological characteristics of some *Aeschynanthus* in Thailand 145
5.3 Molecular identification of cultivated and wild *Aeschynanthus* and a discovery of putatively new *Aeschynanthus* species 155
CHAPTER VI: CONCLUSION 164
REFERENCES 167
BIOGRAPHY 182

LIST OF TABLES

Page

Table 1 Revised sectional classification of *Aeschynanthus* and characteristics of the sections 15

Table 2 *Aeschynanthus* herbarium collected in BKF..... 21

Table 3 The scientific names and RBGE accession numbers of *Aeschynanthus* species used in this study 54

Table 4 The list of wild *Aeschynanthus* samples 56

Table 5 The list of *Aeschynanthus* cultivars bought from Jatujak market 56

Table 6 A list of the ITS primers used in this study and their sequences 64

Table 7 A list of the primers used in RAPD analysis and their sequences 65

Table 8 The list of outgroups and additional *Aeschynanthus* sequences 68

Table 9 A list of chromosome numbers of some Thai *Aeschynanthus* 131

Table 10 Summary of all chromosome numbers counted to date 153

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Page

Fig. 1 Geographical distribution of *Aeschynanthus* 7

Fig. 2 Examples of flower morphology of *Aeschynanthus* 10

Fig. 3 Examples of flower morphology of *Aeschynanthus* (continued) 11

Fig. 4 Comparison of papillae of type A and B seeds 13

Fig. 5 *Aeschynanthus* seeds 17

Fig. 6 The distribution areas of *Aeschynanthus* in Thailand 22

Fig. 7 Repeat units of the nuclear ribosomal DNA 39

Fig. 8 Morphological characteristics of *Aeschynanthus* sp. JJ _001 74

Fig. 9 Morphological characteristics of *Aeschynanthus* sp. JJ _002 74

Fig. 10 Morphological characteristics of *Aeschynanthus* sp. JJ _003 75

Fig. 11 Morphological characteristics of *Aeschynanthus* sp. JJ _004 75

Fig. 12 Morphological characteristics of *Aeschynanthus* sp. JJ _005 76

Fig. 13 The habitat of wild *Aeschynanthus* at San-Ku area (the 1th time) 78

Fig. 14 The habitat of wild *Aeschynanthus* at Doi-Pui (the 1th time) 79

Fig. 15 The habitat of wild *Aeschynanthus* at Doi-Pui (the 2th time) 80

Fig. 16 The habitat of wild *Aeschynanthus* at Doi Inthanon National Park 81

Fig. 17 Genomic DNA bands of some *Aeschynanthus* samples provided by RBGE 83

Fig. 18 Genomic DNA bands of *Aeschynanthus* samples collected from Chiangmai province 83

Fig. 19 Genomic DNA bands of *Aeschynanthus* samples collected from Jatujak market 84

Fig. 20 PCR products of ITS regions of some *Aeschynanthus* samples provided by RBGE 85

Fig. 21 PCR products of ITS regions of *Aeschynanthus* samples collected from Chiangmai province 86

Page

Fig. 22 PCR products of ITS regions of *Aeschynanthus* samples collected from Jatujak market 86

Fig. 23 Four-coloured electropherogram of ITS sequence of *A. javanicus* 89

Fig. 24 Four-coloured electropherogram of ITS sequence of *A. parviflorus* 89

Fig. 25 A 572 bp character-taxon matrix of 80 *Aeschynanthus* taxa 91

Fig. 26 A 571 bp character-taxon matrix of 77 *Aeschynanthus* taxa 99

Fig. 27 A 531 bp character-taxon matrix of 29 *Aeschynanthus* taxa 107

Fig. 28 One phylogram of 202,700 equally most parsimonious trees for 80 *Aeschynanthus* taxa 117

Fig. 29 A semistrict consensus tree of 202,700 most parsimonious trees for 80 *Aeschynanthus* taxa 118

Fig. 30 A 50% majority-rule consensus tree of 202,700 most parsimonious trees of 80 *Aeschynanthus* taxa 119

Fig. 31 Neighbour-joining tree of 80 *Aeschynanthus* taxa 120

Fig. 32 One phylogram of 203,700 equally most parsimonious trees for 77 *Aeschynanthus* taxa 123

Fig. 33 A semistrict consensus tree of 203,700 most parsimonious trees for 77 *Aeschynanthus* taxa 124

Fig. 34 A neighbour-joining tree of 77 *Aeschynanthus* taxa 125

Fig. 35 A neighbour-joining tree of 30 *Aeschynanthus* 127

Fig. 36 PCR-RAPD products of three synonymous *Aeschynanthus* species 129

Fig. 37 *A. andersonii* in metaphase period 132

Fig. 38 *A. humilis* in metaphase period 133

Fig. 39 *A. hildebrandii* in metaphase period 134

Fig. 40 *A. obconicus* in metaphase period 135

Fig. 41 *A. radicans* in metaphase period 136

Fig. 42 *A.* sp. JJ_001 in metaphase period 137

Fig. 43 *A.* sp. JJ_001 in metaphase period (stained with hematoxoxylin dye) 138

Page

Fig. 44 Mapping chromosome numbers to the phylogenetic tree 154

Fig. 45 Flower morphology of *Columnae linaris* 162

Fig. 46 Flower morphology of *Columnae argentea* 162

Fig. 47 Morphological characteristics of *Aeschynanthus radicans* 163

Fig. 48 Flower characteristic of *A.* sp. JJ_001 163

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A.	*Aeschynanthus*
ITS	Internal Transcribed Spacer
nrDNA	nuclear ribosomal DNA
cpDNA	chloroplast DNA
*trn*L intron	$tRNA^{Leu}$ intron
MP	Maximum Parsimony
NJ	Neighbour Joining
µl	Microlitre
rpm	Revolution per minute
g	gram
ml	millilitre
sec	second
bp	base pair
Kb	kilobase
H	hour
°C	degree celcius
min	minute
mM	millimolar
µM	micromolar
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT	room temperature

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย