

สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกล้วยตานี *Musa balbisiana* Colla  
เครื่องมือ และลูกผสม โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ



นางศศิวิมล แสงผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5332-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHYLOGENY OF KLUAI TANI *Musa balbisiana* Colla,  
ITS RELATED CULTIVARS AND HYBRIDS  
BASED ON DNA ANALYSIS



MRS. SASIVIMON SWANGPOL

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biological Sciences

Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2003  
ISBN 974-17-5332-2

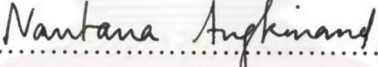
Thesis Title                      Phylogeny of Kluai Tani *Musa balbisiana*  
Colla, Its Related Cultivars and Hybrids Based  
on DNA Analysis  
By                                      Sasivimon Swangpol  
Field of Study                      Biological Sciences  
Thesis Advisor                      Tosak Seelanan, Ph.D.  
Thesis Co-advisor                      Hugo Volkaert, Ph.D.

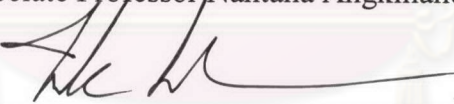
---

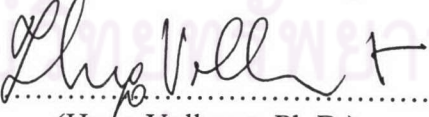
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in  
Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

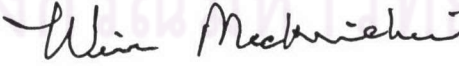
  
..... Dean of the Faculty of Science  
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

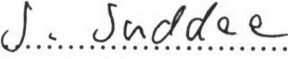
#### THESIS COMMITTEE

  
..... Chairman  
(Associate Professor Nantana Angkinand)

  
..... Thesis Advisor  
(Tosak Seelanan, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-advisor  
(Hugo Volkaert, Ph.D.)

  
..... Member  
(Associate Professor Wina Meckvichai)

  
..... Member  
(Somran Suddee, Ph.D.)

นางศศิวิมล แสงผล : สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกล้วยตานี *Musa balbisiana* Colla เครือญาติ และลูกผสม โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (Phylogeny of Kluai Tani *Musa balbisiana* Colla, Its Related Cultivars and Hybrids Based on DNA Analysis) อาจารย์ที่ปรึกษา : อ. ดร. ต่อกศักดิ์ สีลาพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ Dr. Hugo Volkaert จำนวนหน้า 112 หน้า. ISBN 974-17-5332-2.

กล้วยเป็นพืชปลูกเก่าแก่ที่สุดชนิดหนึ่งของโลก เชื่อกันว่าพันธุ์กล้วยไม่มีเมล็ดที่นิยมปลูกเป็นไม้ผลนั้น พัฒนามาจาก หรือเป็นลูกผสมระหว่างกล้วยป่า 2 ชนิด ได้แก่ กล้วยป่า *Musa acuminata* Colla (AA) และกล้วยตานี *M. balbisiana* Colla (BB) แต่ยังไม่มีการศึกษาที่ยืนยันแน่ชัดในความเชื่อนี้ และแม้ว่าจะเป็นที่ยอมรับทั่วไปว่ามีการปลูกกล้วยเป็นครั้งแรกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ยังไม่ทราบที่ท้องถิ่นใดเป็นแหล่งกำเนิดที่ชัดเจน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสืบหาต้นกำเนิดของกล้วยปลูก โดยเฉพาะพันธุ์ที่ยังมีความสับสนในการจัดกลุ่มอยู่มาก คือกลุ่มที่มีโครโมโซม 3 ชุด ABB/BBA ได้แก่ หิน ชาบา และน้ำว่า โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลคลอโรพลาสต์ จำนวน 4 loci ได้แก่ อินทรอนของยีน *rpl16* และ *ndhA* และลำดับเบสระหว่างยีน *psaA-ycf3* และระหว่างยีน *petA-psbJ-psbL* และโมเลกุลนิวเคลียส ได้แก่ ยีน *GBSS* หรือ *waxy* จากการวิเคราะห์ลำดับ DNA ของพันธุ์กล้วยที่ศึกษา พบว่ามีความแตกต่างหลากหลาย คือ มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ และมีการเพิ่มหรือลดลำดับนิวคลีโอไทด์ (อินเดล) ณ ช่วงตำแหน่งต่างๆแตกต่างกัน การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และเปรียบเทียบการจัดการอินเดลด้วยวิธีต่างๆ ทำให้ได้พบว่ากล้วยตานีที่พบในป่าทางภาคเหนือของไทยมีพันธุกรรมแตกต่างจากพันธุ์ปลูก และลบล้างสมมติฐานเดิมที่กล่าวว่ากล้วยชนิดนี้ไม่ได้มีกำเนิดในประเทศไทย สำหรับในกล้วยลูกผสม ABB/BBA นั้น พบว่ามีจีโนมของแม่และพ่อจากหลายแหล่ง ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของบรรพบุรุษออกจากกันได้ โดยเฉพาะสายพันธุกรรมจากแม่ซึ่งมีความแตกต่างระหว่างจีโนม A และจีโนม B อย่างชัดเจน และยังได้เสนอให้ปรับการเรียกจีโนมของกล้วยบางพันธุ์เพื่อแสดงสายพันธุกรรมจากแม่จาก ABB เป็น BBA อีกด้วย จากการศึกษาในนิวเคลียส พบว่ากล้วยน้ำวามี 3 อัลลีลเท่ากับจำนวนจีโนม และหนึ่งในสามอัลลีลนั้นเป็นอัลลีล B อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้ยังบอกได้ไม่ชัดเจนว่าการคัดเลือกลักษณะพันธุ์ปลูกโดยเกษตรกร มีผลต่อวิวัฒนาการทางโมเลกุลของกล้วย โดยเฉพาะต่อพันธุ์กล้วยลูกผสมอย่างไร และควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในกล้วยหลากหลายชนิดย่อย และหลากหลายพันธุ์ต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต   
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา   
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม 

# # 4273829323 : BIOLOGICAL SCIENCES  
KEY WORDS: *Musa balbisiana* / interspecific hybrids / phylogenetic analysis /  
DNA sequencing / chloroplast genome / nuclear genome

SASIVIMON SWANGPOL : PHYLOGENY of KLUAI TANI *Musa balbisiana* Colla, ITS RELATED CULTIVARS AND HYBRIDS BASED ON DNA ANALYSIS

THESIS ADVISOR : TOSAK SEELANAN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : HUGO VOLKAERT, Ph.D., 112 pp. ISBN 974-17-5332-2.

Bananas is one of the oldest cultivated crops. It is widely believed that edible seedless banana cultivars have been derived from or are hybrids of two wild diploid species, namely *Musa acuminata* Colla (AA) and *M. balbisiana* Colla (BB). Though the banana domestication is believed to have occurred in the Southeast Asian region, the genomic and geographical origin(s) of the ancestral bananas are still uncertain. We are exploring DNA sequence polymorphism to determine the domestication history of bananas with special emphasis on the Southeast Asian triploid ABB/BBA complex; 'Hin' / 'Saba' / 'Namwa'. Four chloroplast (cp-) non-coding loci--*rpl16* and *ndhA* introns, *psaA-ycf3* and *petA-psbJ-psbL* spacers—and a nuclear (nu-) locus, *GBSS* or *waxy*, markers have been developed. By analyzing the four cp-loci combined sequences, the A and B genome derived alleles could be relatively easily distinguished. Polymorphism within each genome included nucleotide substitutions and insertion/deletions (indels). In the hybrid cultivars, the alleles derived from each of the contributing genomes could be separated. Phylogenetic analyses based on these DNA sequence data with different treatments of indels resulted in the discovery of a distinct population of wild *M. balbisiana* in northern Thailand. This finding rejected the hypothesis that this species was not native. Diversity within triploid hybrids was found and particular B genome-rich triploids (ABBs) were given new genome designation as BBAs to indicate their maternal genealogy. In the investigation of the nuclear (nu-) genome, three *GBSS* alleles were found in triploid hybrids 'Namwa' cultivars and one among the three can be designated as B allele. In order to estimate the influence of agricultural selection on the evolutionary history of banana, more samplings and further investigation are required.

Field of Study Biological Sciences

Academic year 2003

Student's signature 

Advisor's signature 

Co-advisor's signature 

## Acknowledgements

The author would like to thank her advisors, Drs. Tosak Seelanan, and Hugo Volkaert, who have been admirable colleagues and mentors. Their expertise and accurate judgement has been invaluable for her work, their kind support and encouragement has been appreciative. Acknowledgements are extended to her committee, Associate Professor Nantana Angkinand, Associate Professor Wina Meckvichai, and Dr. Somran Suddee, for their valuable comments and suggestions, which considerably improved this manuscript.

The author would like to acknowledge these sources of plant materials or DNA, namely Queen Sirikit Garden, Bangkok, Thailand; Pak Chong Student Training Farm, Kasetsart University, Nakorn Ratchasima, Thailand; Dr. Francoise Carreel, CIRAD-FLHOR, Guadeloupe; International Transit Centre (ITC), International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP), Leuven, Belgium; Mr. Samadchai Chatrakhom, Ms. Teunjai Nakkrasem, and the Banana Club, Thailand; and Institute of Plant Breeding, University of the Philippines, Laguna, Philippines. She appreciates for the research facilities at Center for Agriculture and Biotechnology, Kasetsart University, Kampaengsaen Campus, Nakorn Pathom, and Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. This study has been supported by the Biodiversity Research and Training (BRT) project of the Thailand Research Fund (TRF) and Biological Science Ph.D. Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University. The author is grateful for their support. The Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, permitted the author to pursue Ph.D. study with no hesitation, which she is thankful.

The author is deeply in debt to the technical assistance and kind supports of Mss. Jongkol Cheua-ngam, Piyaporn Phansak, Siriporn Jangsutthivorawat, and Dr. Rachel Sotto. Acknowledgements are extended to Ms. Rosarin Pollawatn, Mrs. Parinyanoot Darumas, Ms. Suchada Wongpakam, all mentors and staff at the Plant of Thailand Research Unit, Department of Botany; also to colleagues in the Biological Science Ph.D. program, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Last, but not least, family members of the Chomchalows, the Kosachandra, and the Swangpols owed the author's gratefulness. They all, especially Dr. Narong and Mrs. Srivan Chomchalow, parents; Mrs. Vilasini Kosachandra, sister, Mrs. Somsri Swangpol, mother-in-law, Mr. Jackrawut Swangpol, husband, Mss. Malaivee, and Mapa Swangpol, daughters, have been so helpful in completing this degree. Without whose endless patience and encouragement, the author could not have been able to start nor finish this work. The author would like to express her deep gratitude and dedicate this degree to them.

## Table of Contents

	Page
Thai Abstract .....	iv
English Abstract .....	v
Acknowledgements.....	vi
Table of Contents .....	vii
List of Tables .....	viii
List of Figures .....	ix
Chapter 1 : Introduction .....	1
Chapter 2 : An Overview of <i>Musa balbisiana</i> and the Classification of Edible Bananas .....	3
Chapter 3 : Genealogical Relationships of Banana Cultivars as Inferred from Chloroplast DNA Sequence Analysis.....	7
Chapter 4 : Phylogenetic Utility of the Granule-Bound Starch Synthase ( <i>GBSS</i> ) Gene in Southeast Asian Bananas .....	41
Chapter 5 : General Conclusion.....	61
References.....	62
Appendices	
Appendix A: Rice Complete Chloroplast Genome.....	70
Appendix B: Alignment of <i>Musa</i> Combined Chloroplast Sequences	71
Appendix C: Aligned <i>GBSS</i> Sequence Data Matrix of <i>Musa</i> .....	96
Biography .....	103

## List of Tables

Table	Page
3.1 List of <i>Musa</i> accessions, their genome composition, origins and sources of accessions used in this study .....	14
3.2 Primers for amplifications .....	17
3.3 Chloroplast haplotypes from PCR-RF-SSCP (PRS) analyses of <i>Musa</i> .....	22
3.4 Average base composition, and length comparison of sequences and indels in combined chloroplast sequences of <i>Musa</i> .....	24
4.1 List of <i>Musa</i> accessions, their genome composition, origins and sources of accessions used in this study.....	46


  
 ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## List of Figures

Figures	Page
3.1 Diagram representation of the combined chloroplast sequence used in the phylogenetic analysis of <i>Musa</i> .....	25
3.2 Inverted repeat in <i>petA-psbJ</i> intergenic spacer region in <i>Musa</i> .....	26
3.3 Neighbor-joining tree of <i>Musa</i> chloroplast combined sequences, rooted at the <i>Australimusa</i> bananas.....	27
3.4 Strict consensus tree of 21 equally most-parsimonious trees from the analysis of <i>Musa</i> combined chloroplast sequence data with gap excluded	29
3.5 Indel matrix of <i>Musa</i> combined chloroplast sequences .....	30
3.6 The single most-parsimonious tree from the analysis of <i>Musa</i> combined chloroplast sequence data with gaps recoded.....	31
3.7 Statistical parsimony haplotype networks of cpDNA sequences .....	33
4.1 Structure of <i>GBSS</i> sequence from exon 3 to 9 in <i>Oryza sativa</i> cv group <i>japonica</i> (AF031162) and the portion of <i>GBSS</i> in <i>Musa</i> investigated in this study.....	49
4.2 A 50% majority-rule consensus tree of 98,001 most parsimonious trees from the analysis of <i>GBSS</i> coding regions of <i>Musa</i> with gaps coded as missing.....	51
4.3 A 50% majority-rule consensus tree of 34,775 most parsimonious trees from the analysis of <i>GBSS</i> non-coding regions of <i>Musa</i> with gaps coded as missing.....	52
4.4 A 50% majority-rule consensus tree of 240 most parsimonious trees from the analysis on all variable sites of <i>GBSS</i> in <i>Musa</i> with gaps coded as missing.....	53
4.5 Indel matrix of <i>GBSS</i> sequences in <i>Musa</i> .....	55
4.6 A 50% majority-rule consensus tree of 25,690 most parsimonious trees from the analysis of 1,118 bp of <i>GBSS</i> in <i>Musa</i> with all gaps excluded and recoded.....	56