

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของพีชสกุลไก่แดงบางชนิดในประเทศไทย

นางสาว ป่องทิพย์ ใจดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพุกามศาสตร์

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

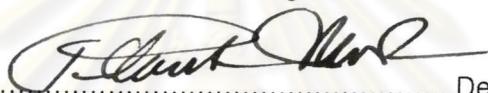
Chulalongkorn University

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.

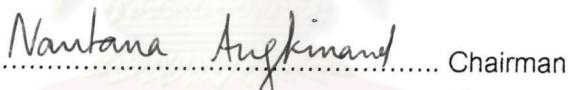
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree



..... Dean of Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE



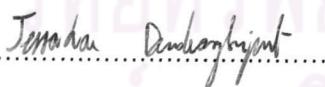
..... Nantana Angkinand Chairman

(Associate Professor Nantana Angkinand)



..... Warawut Chulalaksananukul Thesis Advisor

(Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.)



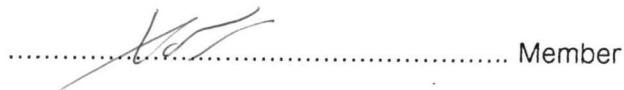
..... Jessada Denduangboripant Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Jessada Denduangboripant, Ph.D.)



..... Sumitra Kongchuensin Member

(Associate Professor Sumitra Kongchuensin)



..... Piyasak Chaumpiuk , Ph.D. Member

ปองพิพย์ ใจดี : ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของพืชสกุลไก่แดงบางชนิดในประเทศไทย (MOLECULAR PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF SOME *Aeschynanthus* IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษา: ดร. วรรุษิ จุฬาลักษณานุกูล
อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. เจริญ เด่นดวงบริพันธ์ 188 หน้า, ISBN 974-53-1449-8.

พืชสกุลไก่แดง (*Aeschynanthus*) เป็นสกุลของพืชอิงอาศัย มีประมาณ 160 ชนิด กระจายทั่วไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีตอกรหงส์สีแดงหรือเหลืองสด ดังนั้นจึงมีการปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ จากการศึกษาเอกสารและตัวอย่างแห้งพบว่า มีอยู่ประมาณ 20 ชนิดในประเทศไทย พืชเหล่านี้ส่วนใหญ่ยังไม่เคยได้รับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ทั้งระดับเซลล์และโมเลกุล ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลไก่แดง โดยเน้นไปที่ลำดับดีเอ็นเอบริเวณไอทีเอสของยีนนิวเคลียร์โรบิโซมอลดีเอ็นเอ ริมจากการรวมตัวอย่างต้นไก่แดงจากการขอสำรวจเก็บตัวอย่างพืชซึ่งมาจากตลาดขายต้นไม้ และการขอตัวอย่างจากองค์กรต่างประเทศ ดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชที่ถูกสกัดและเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ก่อนที่จะหาลำดับเบสและจัดเรียงเทียบกับข้อมูลเดิมของพืชสกุลไก่แดงเพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้วงค์วานิวัฒนาการขึ้นมาใหม่ ผลที่ได้ยืนยันการแบ่งพืชสกุลไก่แดงออกเป็นสองกลุ่มย่อย ต้นไก่แดงในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ขณะที่เขพะ *A. radicans* และ *A. parvifolius* จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 สำหรับ *A. andersonii*, *A. humilis* และ *A. hildebrandi* ซึ่งเป็นสามชนิดที่อาจมีปัญหาเรื่องชื่อช้าช้อนกันนั้น จากการศึกษาทางค้วนวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลและเทคนิคพีซีอาร์อาร์เอฟดี พบว่า *A. andersonii* และ *A. humilis* ควรเป็นชนิดเดียวกัน ตัวอย่างพืชที่เพิ่งเข้าไปใหม่เกือบทั้งหมดที่มีชื่อเดียวกันแต่ต่างเลขประจำตัวกับคุณแม่นั้นที่เคยศึกษามาก่อน จะจับกลุ่มอยู่ด้วยกัน การขาดข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาของต้นไก่แดงหลายชนิดได้จำกัดการอภิปรายถึงรูปแบบการเกิดวิวัฒนาการของเมล็ดของมัน วิทยานิพนธ์นี้ยังได้ใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการระบุชื่อชนิดของต้นไก่แดงทั้งที่เป็นพืชปลูก และพืชตามธรรมชาติได้สำเร็จ เป็นที่น่าสนใจว่าตัวอย่างพืชไก่แดงต้นหนึ่งซึ่งมีตอกรสีชมพูเปลกลิ่นปากปกตินั้น มีลำดับดีเอ็นเอบริเวณไอทีเอสที่เฉพาะตัวและอาจจะเป็นพืชชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยถูกรายงานมาก่อน นอกจากนี้การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของพืชสกุลไก่แดงหากชนิด แสดงให้เห็นว่าโครงโน้มโฉมของพืชเหล่านี้มีขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถจัดเรียงรูปแบบของโครงโน้มโฉมได้ *A. radicans*, *A. obconicus* และ *A. sp. JJ_001* มีจำนวนโครงโน้มโฉมเท่ากับ 32 ส่วน *A. andersonii*, *A. humilis* และ *A. hildebrandii* มีจำนวนโครงโน้มโฉมเท่ากับ 28 การศึกษาจำนวนโครงโน้มโฉมในครั้งนี้ได้ช่วยสนับสนุนการจัด *A. andersonii*, *A. humilis* และ *A. hildebrandii* ให้อยู่ในหมู่ X ตามสัณฐานวิทยาของเมล็ดและความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ซึ่งไม่ปรากฏ

ภาควิชา.....	พุกยศาสตร์.....	ลายมือชื่อนิสิต.....	๒๐๖๗/๑๔๙
สาขาวิชา.....	พันธุศาสตร์.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....	Want Chalabutr
ปีการศึกษา.....	2547.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....	พ.ศ. ๒๕๖๘

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 supposedly 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 Chulalaksanakul*
 Academic year.....2004.....Co-advisor's signature.....*Jessada Denduengboripant*

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 partially 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 Edinburgh (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.

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 <i>Aeschynanthus</i>	
2.1.1 Characteristics of the genus <i>Aeschynanthus</i>	5
2.1.2 Taxonomy of <i>Aeschynanthus</i>	8
2.1.3 Cytological study of the genus <i>Aeschynanthus</i>	18
2.1.4 <i>Aeschynanthus</i> 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 <i>Aeschynanthus</i> cultivars from Jatujak market	73

	Page
4.1.2 Expedition in Chiangmai to collect wild <i>Aeschynanthus</i> 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 <i>Aeschynanthus</i> samples supplied from RBGE	112
4.6.2 Analyses of the ITS data matrix of <i>Aeschynanthus</i> samples bought from Jatujak market	121
4.6.3 Analyses of the ITS data matrix of <i>Aeschynanthus</i> 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 <i>Aeschynanthus</i> and implication for <i>Aeschynanthus</i> taxonomy	139
5.2 Morphological and cytological characteristics of some <i>Aeschynanthus</i> in Thailand	145
5.3 Molecular identification of cultivated and wild <i>Aeschynanthus</i> and a discovery of putatively new <i>Aeschynanthus</i> species	155
CHAPTER VI: CONCLUSION	164
REFERENCES	167
BIOGRAPHY	182

LIST OF TABLES

	Page
Table 1 Revised sectional classification of <i>Aeschynanthus</i> and characteristics of the sections	15
Table 2 <i>Aeschynanthus</i> herbarium collected in BKF.....	21
Table 3 The scientific names and RBGE accession numbers of <i>Aeschynanthus</i> species used in this study	54
Table 4 The list of wild <i>Aeschynanthus</i> samples	56
Table 5 The list of <i>Aeschynanthus</i> 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 <i>Aeschynanthus</i> sequences	68
Table 9 A list of chromosome numbers of some Thai <i>Aeschynanthus</i>	131
Table 10 Summary of all chromosome numbers counted to date	153


**ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

LIST OF FIGURES

	Page
Fig. 1 Geographical distribution of <i>Aeschynanthus</i>	7
Fig. 2 Examples of flower morphology of <i>Aeschynanthus</i>	10
Fig. 3 Examples of flower morphology of <i>Aeschynanthus</i> (continued)	11
Fig. 4 Comparison of papillae of type A and B seeds	13
Fig. 5 <i>Aeschynanthus</i> seeds	17
Fig. 6 The distribution areas of <i>Aeschynanthus</i> in Thailand	22
Fig. 7 Repeat units of the nuclear ribosomal DNA	39
Fig. 8 Morphological characteristics of <i>Aeschynanthus</i> sp. JJ _001	74
Fig. 9 Morphological characteristics of <i>Aeschynanthus</i> sp. JJ _002	74
Fig. 10 Morphological characteristics of <i>Aeschynanthus</i> sp. JJ _003	75
Fig. 11 Morphological characteristics of <i>Aeschynanthus</i> sp. JJ _004	75
Fig. 12 Morphological characteristics of <i>Aeschynanthus</i> sp. JJ _005	76
Fig. 13 The habitat of wild <i>Aeschynanthus</i> at San-Ku area (the 1 th time)	78
Fig. 14 The habitat of wild <i>Aeschynanthus</i> at Doi-Pui (the 1 th time)	79
Fig. 15 The habitat of wild <i>Aeschynanthus</i> at Doi-Pui (the 2 th time)	80
Fig. 16 The habitat of wild <i>Aeschynanthus</i> at Doi Inthanon National Park	81
Fig. 17 Genomic DNA bands of some <i>Aeschynanthus</i> samples provided by RBGE	83
Fig. 18 Genomic DNA bands of <i>Aeschynanthus</i> samples collected from Chiangmai province	83
Fig. 19 Genomic DNA bands of <i>Aeschynanthus</i> samples collected from Jatujak market.....	84
Fig. 20 PCR products of ITS regions of some <i>Aeschynanthus</i> samples provided by RBGE	85
Fig. 21 PCR products of ITS regions of <i>Aeschynanthus</i> samples collected from Chiangmai province	86

Page	
Fig. 22 PCR products of ITS regions of <i>Aeschynanthus</i> samples collected from Jatujak market	86
Fig. 23 Four-coloured electropherogram of ITS sequence of <i>A. javanicus</i>	89
Fig. 24 Four-coloured electropherogram of ITS sequence of <i>A. parviflorus</i>	89
Fig. 25 A 572 bp character-taxon matrix of 80 <i>Aeschynanthus</i> taxa	91
Fig. 26 A 571 bp character-taxon matrix of 77 <i>Aeschynanthus</i> taxa	99
Fig. 27 A 531 bp character-taxon matrix of 29 <i>Aeschynanthus</i> taxa	107
Fig. 28 One phylogram of 202,700 equally most parsimonious trees for 80 <i>Aeschynanthus</i> taxa	117
Fig. 29 A semistrict consensus tree of 202,700 most parsimonious trees for 80 <i>Aeschynanthus</i> taxa	118
Fig. 30 A 50% majority-rule consensus tree of 202,700 most parsimonious trees of 80 <i>Aeschynanthus</i> taxa	119
Fig. 31 Neighbour-joining tree of 80 <i>Aeschynanthus</i> taxa	120
Fig. 32 One phylogram of 203,700 equally most parsimonious trees for 77 <i>Aeschynanthus</i> taxa	123
Fig. 33 A semistrict consensus tree of 203,700 most parsimonious trees for 77 <i>Aeschynanthus</i> taxa	124
Fig. 34 A neighbour-joining tree of 77 <i>Aeschynanthus</i> taxa	125
Fig. 35 A neighbour-joining tree of 30 <i>Aeschynanthus</i>	127
Fig. 36 PCR-RAPD products of three synonymous <i>Aeschynanthus</i> species	129
Fig. 37 <i>A. andersonii</i> in metaphase period	132
Fig. 38 <i>A. humilis</i> in metaphase period	133
Fig. 39 <i>A. hildebrandii</i> in metaphase period	134
Fig. 40 <i>A. obconicus</i> in metaphase period	135
Fig. 41 <i>A. radicans</i> in metaphase period	136
Fig. 42 <i>A. sp. JJ_001</i> in metaphase period	137
Fig. 43 <i>A. sp. JJ_001</i> in metaphase period (stained with hematoxylin dye)	138

	Page
Fig. 44 Mapping chromosome numbers to the phylogenetic tree	154
Fig. 45 Flower morphology of <i>Columnae linaris</i>	162
Fig. 46 Flower morphology of <i>Columnae argentea</i>	162
Fig. 47 Morphological characteristics of <i>Aeschynanthus radicans</i>	163
Fig. 48 Flower characteristic of A. sp. JJ_001	163



ABBREVIATIONS

A.	<i>Aeschynanthus</i>
ITS	Internal Transcribed Spacer
nrDNA	nuclear ribosomal DNA
cpDNA	chloroplast DNA
<i>trnL</i> 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