ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของพืชสกุล *Cassia* ในประเทศไทย

นางสาวกาญจนา ศรีสวัสดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547
ISBN 974-17-6201-1
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR GENETIC RELATIONSHIP OF *Cassia* IN THAILAND

Miss Kanchana Srisawat

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

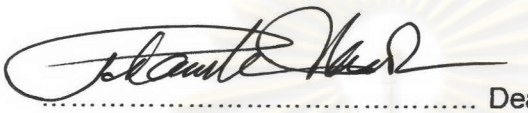
Academic Year 2004

ISBN 974-17-6201-1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Molecular Genetic Relationship of *Cassia* in Thailand
By	Miss Kanchana Srisawat
Field of study	Genetics
Thesis Advisor	Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Jessada Denduangboripant, Ph.D.

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



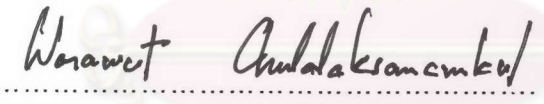
..... Dean of The Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Nantana Angkinand)

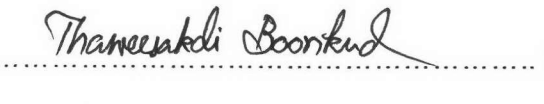


..... Thesis Advisor

(Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.)

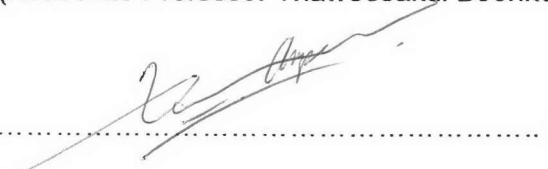
..... Thesis Co-advisor

(Jessada Denduangboripant, Ph.D.)



..... Member

(Associate Professor Thaweesakdi Boonkerd, Ph.D.)



..... Member

(Piyasak Chaumpluk, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กาญจนา ศรีสวัสดิ์ : ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของ *Cassia* ในประเทศไทย. (Molecular Genetic Relationship of *Cassia* in Thailand) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: อ.ดร. เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์ จำนวนหน้า 158 หน้า. ISBN 974-17-6201-1.

พืชสกุล *Cassia* หรือพืชในกลุ่มราชพฤกษ์และชุมเห็ดเทศ เป็นพืชเขตร้อนที่พบได้ทั้งที่เป็นไม้ยืนต้น ไม้พุ่มหรือไม้ล้มลุก มีประโยชน์จากการใช้เป็นพืชสมุนไพรและจากเนื้อไม้ ตาม Flora of Thailand Vol.4 part I รายงานว่าพบพืชสกุลนี้ในประเทศไทยทั้งหมด 22 ชนิด และ 4 ชนิดย่อย อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกพืชสกุลนี้ตาม Flora of Thailand ยังมีความขัดแย้งกับนักวิจัยอื่น เช่น Flora Malesiana Ser. I Vol.12 ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสกุลต่าง ๆ ใน subtribe Cassiinae (มีสกุล *Cassia, Senna* และ *Chamaecrista*) และได้ย้าย *Cassia* 12 ชนิดไปไว้ในสกุล *Senna* และ 4 ชนิดไว้ในสกุล *Chamaecrista* ทำให้เกิดความสับสนทางอนุกรมวิธานขึ้น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงได้นำวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล เช่นการทำ PCR และหาลำดับดีเอ็นเอมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของ *Cassia* ชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ *trn*L intron, ITS regions และ 5.8S subunit ได้ถูกใช้เป็นยีนเป้าหมายในการศึกษา phylogenetics ครั้งนี้ ตารางแมทริกซ์ของลำดับดีเอ็นเอบริเวณ *trn*L intron ของ *Cassia* 16 ชนิดและบริเวณ ITS ของ *Cassia* 13 ชนิดถูกเตรียมขึ้นเพื่อสร้างแผนภูมิ phylogeny ขึ้นมาใหม่ พบว่าแผนภูมิที่สร้างด้วยข้อมูลจากทั้งของ *trn*L intron และ ITS รวมทั้งข้อมูลร่วมระหว่างทั้งสองลำดับดีเอ็นเอนั้นแสดงการแบ่งกลุ่มพืชออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *Cassia* ชนิดที่ถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Senna* ตาม Flora Malesiana โดยที่มีกลุ่มย่อยอีกกลุ่มประกอบไปด้วย *Cassia* ชนิดที่ไม่ถูกย้ายไปแทรกอยู่ในกลุ่มใหญ่นี้ ในขณะที่กลุ่มใหญ่ที่สองประกอบไปด้วย *Cassia* ชนิดที่ถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Chamaecrista* จากนั้นข้อมูลลำดับเบส *trn*L intron ของ *Cassia* อีก 9 ชนิดที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมด้วย ผลที่ได้ใหม่เป็นไปตามรูปแบบของแผนภูมิที่วิเคราะห์ได้มาก่อนนี้และสนับสนุนคำแนะนำของ Flora Malesiana ที่ย้าย *Cassia* บางชนิดไปไว้ในสกุล *Senna* และ *Chamaecrista* นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของพืชสกุล *Cassia* ดังกล่าวและพบว่าโครโมโซมของพืชสกุลนี้มีขนาดเล็กมากยากต่อการนับจำนวนโครโมโซมให้ชัดเจน โดยส่วนใหญ่แล้วประมาณค่าได้เท่ากับ 2n = 22 ถึง 28 การศึกษาครั้งนี้จึงได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้เทคนิคสมัยใหม่ระดับโมเลกุลในการช่วยตอบคำถามทางด้านอนุกรมวิธานที่เป็นปัญหามายาวนานเช่นนี้ได้

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....กาญจนา ศรีสวัสดิ์.....

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4572219623 : MAJOR GENETICS
KEY WORDS: *Cassia* / Molecular Phylogenetics/ *trn*L intron / nrDNA/ ITS/ *Senna*/ *Chamaecrista*
KANCHANA SRISAWAT : MOLECULAR GENETIC RELATIONSHIP OF *Cassia* IN THAILAND. THESIS ADVISOR : WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph. D, THESIS COADVISOR : JESSADA DENDUANGBORIPANT, Ph. D., 158 pp. ISBN 974-17-6201-1.

The genus *Cassia* (family Leguminosae, subfamily Caesalpinioideae, tribe Cassieae, subtribe Cassiinae) is a tropical plant group of either trees, shrubs, or herbs. These plants are so useful from their herbal medical property and their quality woods. According to Flora of Thailand, there are 22 species of *Cassia* found in the country. However, this taxonomic classification does not agree with those of other research groups. For instance, Flora Malesiana re-investigated an intergeneric relationship of the subtribe Cassiinae (*Cassia/Senna/Chamaecrista*) and then moved 12 *Cassia* species to the genus *Senna* and four species to the genus *Chamaecrista*. To solve this taxonomic problem, molecular techniques such as PCR and DNA sequencing were introduced to study evolutionarily genetic relationships among *Cassia* species in Thailand. Chloroplast *trn*L intron sequence and nrDNA ITS regions included 5.8S subunit were used as the gene targets for this phylogenetic study. A data matrix of *trn*L intron sequences of 16 *Cassia* that of ITS regions of 13 *Cassia* were prepared and thereafter used for a phylogenetic reconstruction. Phylogenetic trees from *trn*L intron and ITS sequences including 5.8S subunit, also the combined data of both regions revealed two major clades. One clade contained *Cassia* species moved to the genus *Senna* following Flora Malesiana and having a subclade of *Cassia* species remaining to be *Cassia* sitting within this major clade. The other major clade contained *Cassia* moved to the genus *Chamaecrista*. Moreover, *trn*L intron sequence data of nine more members of the subtribe Cassiinae retrieved from GenBank database, were included to the data matrix and phylogenetically reanalysed. The tree results followed the formula pattern and supported the recommendation of Flora Malesiana. Moreover, Cytological investigations of these *Cassia* species were also performed and revealed that chromosomes approximately of this genus were too small to be exactly counted. Most of them were found to be 2n = 22 to 28. All of this M.Sc. thesis has pointed an importance of using molecular techniques to clarify such taxonomic problem.

Department.....Botany.....Student's signature.....Kanchana Srisawat.....
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 Dr. Jessada Denduangboripant, for their valuable advice, guidance, encouragement, and support throughout this thesis. My gratitude is also extended to Assoc. Prof. Nantana Angkinand, Assoc. Prof. Dr. Thaweesakdi Boonkerd and Dr. Piyasak Cha-umphruk for serving as thesis committee. In addition, my special thank is to Mr. Sahanat Pechsri for his technical service in plant specimens.

I would like to extend my sincere thank to staff and friends of the Botany and Biology Department, Biotechnology Program and CBCB members especially for Miss Pongtip Jaidee and Miss Atchariya Chaiyarat for their help and warm relationship.

This work was supported by the Graduate school fund of Chulalongkorn University, Department of Botany and Department of Biology.

Finally, the greatest indebtedness is expressed to my family for unlimited love, understanding, and support, love and encouragement.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....x

LIST OF FIGURES.....xi

ABBREVIATIONS.....xv

CHAPTER 1: INTRODUCTION.....1

CHAPTER 2: BACKGROUND

2.1 *Cassia*

2.1.1 The genus *Cassia* and the subtribe Cassiinae.....3

2.1.2 *Cassia* in Thailand and its taxonomy.....11

2.1.3 Descriptions and collecting localities of *Cassia* species found in Thailand.....13

2.2 Molecular phylogenetics

2.2.1 Definition and principle of molecular phylogenetics.....30

2.2.2 Gene targets.....33

2.2.2.1 Chloroplast *trn*L intron.....34

2.2.2.2 ITS regions of nuclear ribosomal DNA.....35

2.2.3 Phylogenetic tree reconstruction methods

2.2.3.1 DNA Data matrix preparation.....39

2.2.3.2 Maximum parsimony and Neighbour-joining.....39

2.2.2.3 Tree rooting and consensus tree analyses.....42

2.2.2.4 Tree evaluation.....43

CONTENTS (continued)

Page

CHAPTER 3: MATERIALS AND METHODS

3.1 Materials

3.1.1 Equipments.....45

3.1.2 Chemicals.....46

3.1.3 Plant materials.....47

3.2 Molecular phylogenetic experiments

3.2.1 DNA extraction.....49

3.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR).....51

3.2.3 Purification of PCR products.....51

3.2.4 DNA cycle sequencing.....53

3.2.5 Phylogenetic analyses.....54

3.3 Cytogenetic experiment

3.3.1 Root preparation and collection.....56

3.3.2 Chromosome staining and counting.....56

3.3.3 Meiotic study in Germline cells.....57

CHAPTER 4: RESULTS

4.1 DNA extraction.....59

4.2 PCR amplification

4.2.1 PCR amplification of *trn*L intron.....59

4.2.2 PCR amplification of ITS regions.....60

4.3 PCR product purification and DNA sequencing.....61

4.4 Alignment of DNA sequences.....65

4.5 Phylogenetic analysis

4.5.1 *trn*L intron sequence data set.....67

4.5.2 ITS1-5.8S-ITS2 sequence data set.....98

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS (continued)

Page

4.5.3 Combined sequence data of *trn*L intron and ITS regions.....110

4.6 Cytogenetic study.....115

CHAPTER 5: DISCUSSION

5.1 Molecular phylogenetic analyses of *Cassia* in Thailand.....121

5.2 Morphological and cytological characteristics of *Cassia* in Thailand.....126

5.3 Implications for taxonomy of *Cassia* in Thailand.....136

CHAPTER 6: CONCLUSION.....138

REFERENCES.....140

APPENDICES.....147

BIOGRAPHY.....160

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Page

Table 1. comparison between classification systems of subtribe Cassiinae.....7

Table 2. collecting localities of *Cassia* in Thailand.....28

Table 3. plant materials used in the study.....48

Table 4. sequences of primers in this experiment.....52

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Page

Fig. 1 flower characteristics of *C. fistula*.....14

Fig. 2 flower characteristics of *C. garrettiana* 14

Fig. 3 flower characteristics of *C. bakeriana*.....16

Fig. 4 flower characteristics of *C. alata*.....16

Fig. 5 flower characteristics of *C. grandis*.....18

Fig. 6 flower characteristics of *C. javanica*.....18

Fig. 7 flower characteristics of *C. hirsuta*.....20

Fig. 8 flower characteristics of *C. spectabilis*.....20

Fig. 9 flower characteristics of *C. sophera*.....22

Fig. 10 flower characteristics and of *C. surattensis*.....22

Fig. 11 flower characteristics of *C. occidentalis*.....24

Fig. 12 flower characteristics of *C. tora*.....24

Fig. 13 the location of *trn*L intron in chloroplast genome.....38

Fig. 14 ribosomal gene copies in nuclear genome.....38

Fig. 15 PCR products of *trn*L intron (size around 600 bp) compared with 100 bp ladder marker.....59

Fig. 16 PCR products of ITS regions of nrDNA (~800 bp) compared with 100 bp ladder marker.....60

Fig. 17 purified PCR product of *trn*L intron compare with 100 bp ladder marker.....62

Fig. 18 four-coloured electropherogram of *trn*L intron sequence of *C. hirsuta*.....63

Fig. 19 four-coloured electropherogram of ITS sequence of *C. bakeriana*.....63

Fig. 20 four-coloured electropherogram of ITS sequence of *C. surattensis*.....64

Fig. 21 a sample of FASTA sequence format of *trn*L intron sequences.....64

Fig. 22 a sample of an aligned sequence data matrix using ClustalX program.....65

LIST OF FIGURES (continued)

Page

Fig. 23 a sample of NEXUS file format using for phylogenetic analyses in the program PAUP*.....66

Fig. 24 a 646 bp character-taxon matrix of 16 Thai *Cassia* species based on *trn*L intron sequences.....67

Fig. 25 one phylogram of 14 equally most parsimonious trees (87 steps in length) for 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data.....73

Fig. 26 strict consensus tree from 14 most parsimonious trees of 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data.....76

Fig. 27 semistrict consensus tree from 14 most parsimonious trees of 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data.....77

Fig. 28 50% majority-rule consensus tree from 14 most parsimonious trees of 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data.....78

Fig. 29 neighbour-joining tree of 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data.....80

Fig. 30 a 657 bp character-taxon matrix of 16 *Cassia* species based on *trn*L intron sequences compared with nine additional New-World Cassiinae species.....81

Fig. 31 one phylogram of 6 equally most parsimonious trees (127 steps in length) for 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data compared with nine additional Cassiinae New-World species.....90

Fig. 32 strict consensus tree from 6 most parsimonious trees of 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data compared with nine additional Cassiinae New-World species.....93

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES (continued)

Page

Fig. 33 semistrict consensus tree from 6 most parsimonious trees of 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data compared with nine additional Cassiinae New-World species.....94

Fig. 34 50% majority-rule consensus tree from 6 most parsimonious trees of 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data compared with nine additional Cassiinae New-World species.....95

Fig. 35 neighbour-joining tree of 16 *Cassia* in Thailand based on *trn*L intron sequence data compared with nine additional Cassiinae New-World species.....97

Fig. 36 a 913 bp character taxa matrix of Thai *Cassia* based on ITS regions sequences for doing tree reconstruction.....98

Fig. 37 only one most parsimonious tree (956 steps in length) found from ITS data matrix of 13 *Cassia* species in Thailand.....107

Fig. 38 neighbour-joining tree of 13 *Cassia* in Thailand based on ITS sequence data.....109

Fig. 39 only one most parsimonious tree (1030 steps in length) found from 13 *Cassia* species in Thailand based on combined sequence data.....112

Fig. 40 neighbour-joining tree of 13 *Cassia* in Thailand based on combined sequence data.....114

Fig. 41 late metaphase I of microsporocyte of *C. occidentalis*.....116

Fig. 42 metaphase I of microsporocyte of *C. surattensis*.....116

Fig. 43 metaphase I of microsporocyte of *C. tora*.....117

Fig. 44 early metaphase I in microsporocyte of *C. siamea*.....117

Fig. 45 metaphase I in microsporocyte of *C. garrettiana*.....118

Fig. 46 late prophase (diakinesis) in microsporocyte of *C. fistula*.....118

LIST OF FIGURES (continued)

Page

Fig. 47 early metaphase I in microsporocyte of *C. sophera*.....119

Fig. 48 late prophase (diakinesis) in microsporocyte of *C. javanica*.....119

Fig. 49 late prophase (diakinesis) of microsporocyte of *C. spectabilis*.....120

Fig. 50 prophase I of microsporocyte of *C. timoriensis*.....120

Fig. 51 mapping of morphological characters and chromosome numbers to the phylogenetic tree of 16 *Cassia* species in Thailand based on *trn*L intron sequences.....130

Fig. 52 mapping of morphological characters and chromosome numbers to the phylogenetic tree of 16 *Cassia* species in Thailand based on *trn*L intron sequences.....131

Fig. 53 mapping of morphological characters and chromosome numbers to the phylogenetic tree of 16 *Cassia* species in Thailand based on *trn*L intron sequences.....132

Fig. 54 mapping of morphological characters and chromosome numbers to the phylogenetic tree of 16 *Cassia* species in Thailand based on ITS regions sequences.....133

Fig. 55 mapping of morphological characters and chromosome numbers to the phylogenetic tree of 16 *Cassia* species in Thailand based on ITS regions sequences.....134

Fig. 56 mapping of morphological characters and chromosome numbers to the phylogenetic tree of 16 *Cassia* species in Thailand based on ITS regions sequences.....135

ABBREVIATIONS

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
C.	*Cassia*
S.	*Senna*
Ch.	*Chamaecrista*
RT	room temperature

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย