

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.นสพ.สุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20191

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ของชา (*Camellia* spp.)
จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Chalcone synthase*

จิตรอนงค์ คำรส

12 ก.ค. 2556
3 2 3 0 6 4

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มิถุนายน 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ จิตรอนงค์ คำรศ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญศักดิ์)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ถนอมศักดิ์ บุญศักดิ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงทิพย์ มุลมั่งมี)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญศักดิ์)
.....กรรมการ
(ดร. ถนอมศักดิ์ บุญศักดิ์)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุภูมิ พระประเสริฐ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุษาวดี ตันติวานุรักษ์)
วันที่ 24 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2556

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษา และให้เกียรติเป็นประธานพิจารณา วิทยานิพนธ์ และดร.ธนอมศักดิ์ บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ท่านได้ให้ข้อเสนอแนะ จุดประกายความคิด ในการทำวิทยานิพนธ์ด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ อันมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อมวลมนุษยชาติทั้งในปัจจุบันและอนาคต ตลอดจนเป็นที่ปรึกษาในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในการทำวิจัย เป็นกำลังใจ และแรงผลักดันให้ข้าพเจ้าได้มีแรงบันดาลใจ จัดทำรายงานฉบับนี้ให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์ทั้งในด้านเนื้อหาและองค์ความรู้ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง และขอขอบพระคุณท่าน เป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์ และคณิตศาสตร์ (สควค.) ที่สนับสนุนทุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้าในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ ตลอดจนเจ้าของงานวิจัยที่ข้าพเจ้า นำมาใช้อ้างอิงในวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์ สถานที่ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัวคำรส เพื่อนร่วมงาน โรงเรียนท่าวังผาพิทยาคม เพื่อนร่วมรุ่นปริญญาโท รหัส 53 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาตลอด ขอขอบคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์เล่มนี้จะก่อคุณค่าและประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษา ความรู้ด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ และข้าพเจ้าขอกราบเป็นกตเวทิตาคุณแด่คณาจารย์ทุกท่าน ผู้ซึ่ง ประสทธิประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าตลอดมาทั้งในอดีตและปัจจุบัน

จิตรอนงค์ คำரச

53990128: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)

คำสำคัญ: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ/ *Camellia*/ *ChS*/ *Chalcone synthase*/ RFLP

จิตรอนงค์ คำரச: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ของชา (*Camellia* spp.) จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Chalcone synthase* (DNA FINGERPRINT *in silico* ANALYSIS OF THE TEA PLANT (*Camellia* spp.) BASED ON PARTIAL *CHALCONE SYNTHASE* GENE SEQUENCES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph. D., ถนอมศักดิ์ บุญภักดี, D.Agr.Sc. 80 หน้า. ปี พ.ศ. 2556.

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *Chalcone synthase* (*ChS*) จำนวน 64 ข้อมูลที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ณ เดือนมีนาคม พ.ศ. 2555 ขนาด 768 คู่เบส ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) โดยตัดด้วยเอนไซม์ *AclI*, *BbvI*, *HpaII* และ *RsaI* ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาแตกต่างกันจำนวน 8, 6, 7 และ 3 รูปแบบตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเอนไซม์ตัดร่วมกันทั้ง 4 ชนิดปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกันจำนวน 27 รูปแบบ สามารถจำแนกชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ ชาจีน (*C. sinensis*) ชาอัสสัม (*C. sinensis* var. *assamica*) และชาน้ำมัน (*C. oliefera*) ออกจากกันได้

53990128: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M. Sc. (BIOLOGY EDUCATION)

KEYWORDS: DNA fingerprint/ *Camellia*/ *ChS*/ *Chalcone synthase*/ RFLP

JITANONG KHAMROS: DNA FINGERPRINT *in silico* ANALYSIS OF THE TEA PLANT (*Camellia* spp.) BASED ON PARTIAL *CHALCONE SYNTHASE* GENE SEQUENCES.

ADVISORY COMMITTEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph.D., TANOMSAK

BOONPHAKDEE, D.Agr.Sc. 80 P. 2013.

DNA fingerprint of the tea plant genus *Camellia* based on *Chalcone synthase* (*ChS*) sequences, was investigated. The partial 768-bp *ChS* gene sequences that could be achieved by PCR (Polymerase Chain Reaction) were retrieved from GenBank (as of March, 2012). Sixty-four data were then analyzed by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Eight, 6, 7 and 3 different DNA profiles were detected after digestion of the *ChS* gene with *AccI*, *BbvI*, *HpaII* and *RsaI*, respectively. Later, 27 characteristic RFLP patterns were identified for all 64 samples using these composite digestive enzymic profiles. Of these, the restriction endonuclease patterns are able to differentiate between *C. sinensis*, *C. sinensis* var. *assamica* and *C. oleifera*, the typical varieties of tea that planted extensively throughout the North of Thailand.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	2
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ชีววิทยาของชา.....	4
ลักษณะวิทยาของชา.....	4
เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล	6
ชีวสารสนเทศศาสตร์	9
เอนไซม์ Chalcone synthase (CHS)	15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
อุปกรณ์	18
โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ศึกษา	18
เว็บไซต์ปฏิบัติการออนไลน์	18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน <i>Chalcone synthase</i>	18
การสร้าง Phylogenetic tree.....	21
4 ผลการวิจัย.....	22
ข้อมูลของยีน <i>ChS</i> ของชาสกุล <i>Camellia</i>	22
การจำลองรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ.....	23
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Phylogenetic tree.....	26
5 อภิปรายและสรุปผล	32
อภิปรายผลการทดลอง.....	32
สรุปผลการทดลอง.....	35
ข้อเสนอแนะ	35
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก.....	39
ภาคผนวก ก	40
ภาคผนวก ข	51
ภาคผนวก ค	72
ภาคผนวก ง	74
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	82

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3-1 ตัวอย่างและข้อมูลของชาสกุล <i>Camellia</i> ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank	19
4-1 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลของ ชาสกุล <i>Camellia</i>	24
4-2 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>ChS</i> ในชาสกุล <i>Camellia</i> ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>AclI</i> , <i>BbvI</i> , <i>HpaII</i> และ <i>RsaI</i>	30
ข-1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>AclI</i>	52
ข-2 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>BbvI</i>	57
ข-3 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>HpaII</i>	62
ข-4 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>RsaI</i>	67

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชา	6
2-2 กระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	7
2-3 ตัวอย่างรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ในส้มอินเดีย <i>Citrus</i>	9
2-4 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ CHS	14
2-5 วิธีการเกิดปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ Chalcone synthase.....	15
4-1 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน <i>ChS</i> ในรูปแบบ FASTA ของชาจีน	22
4-2 บริเวณของยีน <i>ChS</i> ที่ศึกษาในครั้งนี้ของชาจีน.....	23
4-3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของชาสกุล <i>Camellia</i> ในส่วนของยีน <i>ChS</i> ตัดด้วยเอนไซม์ <i>AclI</i> , <i>BbvI</i> , <i>HpaII</i> และ <i>RsaI</i> บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 % เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder	27
4-4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>AclI</i>	28
4-5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>BbvI</i>	28
4-6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>HpaII</i>	28
4-7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>RsaI</i>	29
4-8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชากลุ่มใหญ่ (1-GU722500, 2-..., 18-GU722471)	29
4-9 เคนโครแกรมแสดงความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน <i>ChS</i> ของชาสกุล <i>Camellia</i>	31
ก-1 ผล Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์	41
ค-1 Phylogenetic tree ในส่วนของยีน <i>ChS</i> ของชาสกุล <i>Camellia</i>	73