

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณยีน *Chalcone synthase* ของชาสกุล *Camellia* ทั้งหมด

64 ข้อมูล ด้วยโปรแกรม ClustalX version 2.0.11

	10	20	30	40	50	60	70	80	
D26594	AAACCCAAAT	GFGTGTGCT	ACATGGCACC	TTCACGGAT	GCTAGGCAAG	ACATGGTGT	TGTTGAAGTC	CCAAAACCTAG	80
GU722476				A					46
GU722466				A					46
GU722451				A					46
GU722480				A					46
GU722479				A					46
GU722467				A					46
GU722463				A					46
GU722460				A					46
GU722491				A					46
GU722449				A					46
GU722510				A					46
GU722507				A					46
GU722506				A					46
GU722492				A					46
GU722486				A					46
GU722475				A					46
GU722474				A					46
GU722464				A					46
GU722456				A					46
GU722450				A					46
GU722511				A					46
GU722500				A					46
GU722499				A					46
GU722498				A					46
GU722496				A					46
GU722494				A					46
GU722481				A					46
GU722465				A					46
GU722461				A					46
GU722457				A					46
GU722503				A					46
GU722509				A					46
GU722488				A					46
GU722487				A					46
GU722483				A					46
GU722473				A					46
GU722472				A					46
GU722469				A					46
GU722468				A					46
GU722512				A					46
GU722504				A					46
GU722495				A					46
GU722493				A					46
GU722490				A					46
GU722477				A					46
GU722471				A					46
GU722454				A					46
GU722501				A					46
GU722482				A					46
GU722470				A					46
GU722462				A					46
GU722459				A					46
GU722448				A					46
GU722505				A					46
GU722484				A					46
GU722478				A					46
GU722508				A					46
GU722489				A					46
GU722452				A					46
GU722455				A					46
GU722497				A					46
GU722485				A					46
GU722513				A					46
AY146704				A					22

ภาพภาคผนวก ก-1 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Chs* ในชาสกุล *Camellia* จำนวน 64 ข้อมูล ซึ่งมีความแตกต่างกันน้อย โดยตัวเลขด้านบนระบุตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ (มีต่อหน้าถัดไป)

	90	100	110	120	130	140	150	160	
D26594	GCAGAGAGGC	TGCAACCAAG	GCCATCAAAG	AATGGGGCCA	GCCGAAGTCC	AAAATCAGCC	ACTTGGTTTT	CTGCACCACT	160
GU722476									126
GU722466									126
GU722451									126
GU722480									126
GU722479								A.	126
GU722467								A.	126
GU722463								A.	126
GU722460									126
GU722491								A.	126
GU722449								C	126
GU722510						T			126
GU722507								A.	126
GU722506								A.	126
GU722492									126
GU722486								A.	126
GU722475								A.	126
GU722474								A.	126
GU722464								A.	126
GU722456								A.	126
GU722450								A.	126
GU722511								A.	126
GU722500								A.	126
GU722499									126
GU722498					C			A.	126
GU722496					C			A.	126
GU722494								A.	126
GU722481							T	A.	126
GU722465								A.	126
GU722461								A.	126
GU722457								A.	126
GU722503								A.	126
GU722509								A.	126
GU722488								A.	126
GU722487								A.	126
GU722483								A.	126
GU722473								A.	126
GU722472								A.	126
GU722469								A.	126
GU722468									126
GU722512	G				C				126
GU722504								A.	126
GU722495								A.	126
GU722493								A.	126
GU722490								A.	126
GU722477								A.	126
GU722471									126
GU722454						T			126
GU722501								A.	126
GU722482								A.	126
GU722470							T		126
GU722462	G				C				126
GU722459								A.	126
GU722448									126
GU722505								A.	126
GU722484								A.	126
GU722478								A.	126
GU722508								A.	126
GU722489								A.	126
GU722452					A		T	A.	126
GU722455		A						A.	126
GU722497	G							A.	126
GU722465								A.	126
GU722513			G		C		T		126
AY146704								A.	102

ภาพภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

	170	180	190	200	210	220	230	240	
D26594	AGTGGCGTCG	ACATGCCCGG	GGCCGATTAC	CAACTCACCA	AGCTCCTCGG	TCTCCGTCCT	TCTGTCAAGC	GGCTCATGAT	240
GU722476									206
GU722466									206
GU722451									206
GU722460									206
GU722479			T.....			C.....		C.....	206
GU722467			T.....			C.....		C.....	206
GU722463			T.....			C.....		C.....	206
GU722460		T.....	T.....					T.....	206
GU722491			T.....			C.....		T.....	206
GU722449			T.....					C.....	206
GU722510			T.....					C.....	206
GU722507			T.....			C.....		C.....	206
GU722506			T.....			C.....		C.....	206
GU722492			T.....			C.....		C.....	206
GU722486			T.....			C.....		C.....	206
GU722475			T.....			C.....		C.....	206
GU722474			T.....			C.....		C.....	206
GU722464			T.....			C.....		C.....	206
GU722456			T.....			C.....		C.....	206
GU722450			T.....			C.....		C.....	206
GU722511			T.....			C.....		C.....	206
GU722500			T.....			C.....		C.....	206
GU722499			T.....			C.....		C.....	206
GU722498			T.....			C.....		C.....	206
GU722496			T.....			C.....		C.....	206
GU722494			T.....			C.....		C.....	206
GU722481			T.....			C.....		C.....	206
GU722465			T.....			C.....		C.....	206
GU722461			T.....			C.....		C.....	206
GU722457			T.....			C.....		C.....	206
GU722503			T.....			C.....		C.....	206
GU722509			T.....			C.....		C.....	206
GU722488			T.....			C.....		C.....	206
GU722487			T.....			C.....		C.....	206
GU722483			T.....			C.....		C.....	206
GU722473			T.....			C.....		C.....	206
GU722472			T.....			C.....		C.....	206
GU722469			T.....			C.....		C.....	206
GU722468			T.....			C.....		C.....	206
GU722512			T.....			C.....		C.....	206
GU722504		G.....	T.....			C.....		C.....	206
GU722495			T.....			C.....		C.....	206
GU722493		G.....	T.....			C.....		C.....	206
GU722490			T.....			C.....		C.....	206
GU722477		G.....	T.....			C.....		C.....	206
GU722471			T.....			C.....		C.....	206
GU722454			T.....			C.....		C.....	206
GU722501			T.....			C.....		C.....	206
GU722482		G.....	T.....			C.....		C.....	206
GU722470			T.....			C.....		C.....	206
GU722462			T.....			C.....		C.....	206
GU722459			T.....			C.....		C.....	206
GU722448			T.....			C.....		C.....	206
GU722505			T.....			C.....		C.....	206
GU722464			T.....			C.....		C.....	206
GU722478			T.....			C.....		C.....	206
GU722508			T.....			C.....		C.....	206
GU722489			T.....			C.....		C.....	206
GU722452			T.....			C.....		C.....	206
GU722455			T.....			C.....		C.....	206
GU722497			T.....			C.....		C.....	206
GU722485			T.....			C.....		C.....	206
GU722513			T.....			C.....		C.....	206
AY146704			T.....			C.....		C.....	182

ภาพภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

	250	260	270	280	290	300	310	320	
D26594	GTACCAACAA	GGTTGCTTTG	CCGGCGGCAC	CGTGCTCCGC	CTAGCCAAAG	ACCTAGCTGA	GAACAACAAA	GGTGCTCGGG	320
GU722476									286
GU722466									286
GU722451									286
GU722480				T					286
GU722479									286
GU722467									286
GU722463									286
GU722460									286
GU722491									286
GU722449									286
GU722510							T		286
GU722507			T						286
GU722506									286
GU722492				T					286
GU722486				T					286
GU722475									286
GU722474									286
GU722464							T		286
GU722456									286
GU722450									286
GU722511				T		N			286
GU722500								T	286
GU722499	T						T		286
GU722498									286
GU722496									286
GU722494							T		286
GU722481									286
GU722465							T		286
GU722461							T		286
GU722457				T					286
GU722503								N	286
GU722509							T		286
GU722488							T		286
GU722487									286
GU722483							T		286
GU722473							T		286
GU722472									286
GU722469							T		286
GU722468									286
GU722512									286
GU722504							T		286
GU722495									286
GU722493									286
GU722490									286
GU722477							T		286
GU722471									286
GU722454				T			T		286
GU722501									286
GU722482							T		286
GU722470									286
GU722462			T		T				286
GU722459									286
GU722448					T				286
GU722505			A						286
GU722484									286
GU722478							A		286
GU722508					T			A	286
GU722489			T	T					286
GU722452							T		286
GU722455				T					286
GU722497				T					286
GU722485					T				286
GU722513			T	A	A				286
AY146704					T				286

ภาพภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

	330	340	350	360	370	380	390	400	
D26594	TCCTAGTTGT	GTGTTTCGGAA	ATCACTGCAG	TCACCTTCCG	TGGGCCTAGT	GATGCCCATC	TTGATAGCCT	TGTGGGCCAG	400
GU722476									366
GU722466									366
GU722451									366
GU722480									366
GU722479									366
GU722467									366
GU722463									366
GU722460									366
GU722491				T					366
GU722449									366
GU722510									366
GU722507									366
GU722506				T					366
GU722492									366
GU722486									366
GU722475									366
GU722474									366
GU722464	T								366
GU722456									366
GU722450									366
GU722511									366
GU722500									366
GU722499									366
GU722498									366
GU722496									366
GU722494									366
GU722481									366
GU722465									366
GU722461				T					366
GU722457									366
GU722503									366
GU722509									366
GU722488									366
GU722487									366
GU722483									366
GU722473									366
GU722472									366
GU722469									366
GU722468									366
GU722512	T								366
GU722504									366
GU722495									366
GU722493	C	A							366
GU722490									366
GU722477									366
GU722471				T					366
GU722454									366
GU722501				T					366
GU722482									366
GU722470				T			A		366
GU722462	T								366
GU722459									366
GU722448				T					366
GU722505		A		T			C		366
GU722484				T					366
GU722478				T			A		366
GU722508				T			A		366
GU722489			T	T					366
GU722452				T					366
GU722455				T			A		366
GU722497		C		T		C	A		366
GU722485				T	T		A		366
GU722513		C				C			366
AY146704				T	T		A		342

ภาพภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

	410	420	430	440	450	460	470	480
D26594	GCCTTATTTG	GTGACGGTGC	AGCTGCTATT	ATACTTGGGT	CAGACCCAAT	TCCCGAGGTT	GAGAAGCCGT	TGTTTGAGTT
GU722476								
GU722466								
GU722451								
GU722480								
GU722479								
GU722467								
GU722463								
GU722460								
GU722491								
GU722449								
GU722510								
GU722507								
GU722506								
GU722492								
GU722486								
GU722475								
GU722474								
GU722464								
GU722456								
GU722450								
GU722511								
GU722500								
GU722499								
GU722498								
GU722496								
GU722494								
GU722481								
GU722465								
GU722461								
GU722457								
GU722503								
GU722509								
GU722488								
GU722487								
GU722483								
GU722473								
GU722472								
GU722469								
GU722468								
GU722512								
GU722504								
GU722495								
GU722493								
GU722490								
GU722477								
GU722471								
GU722454								
GU722501								
GU722482								
GU722470								
GU722462								
GU722459								
GU722448								
GU722505								
GU722484								
GU722478								
GU722508								
GU722489								
GU722452								
GU722455								
GU722497								
GU722485								
GU722513								
AY146704								

ภาพภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

	490	500	510	520	530	540	550	560	
D26594	GGTCTCAGCG	GCTCAAAACCA	TCCTCCCGGA	CAGCGATGGT	GCTATCGATG	GGCATCTTCG	TGAAGTGGGC	CTTACATTCC	560
GU722476				C					526
GU722466				C					526
GU722451				C					526
GU722480				C					526
GU722479				C					526
GU722467				C					526
GU722463					T				526
GU722460			A	C					526
GU722491				C					526
GU722449	T			C					526
GU722510			A	C	T				526
GU722507				C					526
GU722506				C					526
GU722492			A	C					526
GU722486				C		C			526
GU722475				C					526
GU722474				C					526
GU722464				C					526
GU722456				C					526
GU722450				C	T				526
GU722511				C					526
GU722500			A	C					526
GU722499				C					526
GU722498					T				526
GU722496				C					526
GU722494				C					526
GU722481				C					526
GU722465			A	C					526
GU722461				C					526
GU722457				C	T				526
GU722503			A	C	T				526
GU722509			A	C					526
GU722488	A			C					526
GU722487			A	C	T				526
GU722483			A	C					526
GU722473	A		A	C					526
GU722472			A	C	T				526
GU722469			A	C					526
GU722468			A	T	C	T			526
GU722512	A			C					526
GU722504	T	A	A						526
GU722495			A	C	T				526
GU722493				C					526
GU722490			A	C	T				526
GU722477	A		A	C					526
GU722471			A	T	C	T			526
GU722454				C					526
GU722501			A	C	T				526
GU722482	T	A	A			A			526
GU722470			A	C	A				526
GU722462		C	A	C					526
GU722459			A	C	T				526
GU722448			A	C	T				526
GU722505	C		A	C	T				526
GU722484			A	T	C	T			526
GU722478			A	C	T				526
GU722508			A	T	C	T			526
GU722489	A		A	C	C				526
GU722452				C	A				526
GU722455				T	C	T			526
GU722497			A	C	C				526
GU722485			A	T	C	T			526
GU722513		C	A	C	C	T	A		526
AY146704			A	T	C	T			502

ภาพภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

	570	580	590	600	610	620	630	640	
D26594	ATCTCCTCAA	GGATGTTCT	GGGCTTATTT	CCAAGAACAT	AGAGAAGAGT	CTAAATGAGG	CATTCCAACC	CTTGAACATC	640
GU722476									606
GU722466									606
GU722451									606
GU722480									606
GU722479									606
GU722467									606
GU722463									606
GU722460									606
GU722491									606
GU722449									606
GU722510									606
GU722507					G				606
GU722506									606
GU722492									606
GU722486									606
GU722475					G				606
GU722474									606
GU722464									606
GU722456									606
GU722450									606
GU722511					G				606
GU722500									606
GU722499									606
GU722498									606
GU722496									606
GU722494					G				606
GU722481					G				606
GU722465									606
GU722461									606
GU722457									606
GU722503									606
GU722509									606
GU722488									606
GU722487									606
GU722485									606
GU722473									606
GU722472									606
GU722469									606
GU722468		G							606
GU722512									606
GU722504									606
GU722495									606
GU722493			C						606
GU722490									606
GU722477									606
GU722471					A				606
GU722454		G		G					606
GU722501									606
GU722482									606
GU722470									606
GU722462									606
GU722459		A							606
GU722448								T	606
GU722505									606
GU722484									606
GU722478									606
GU722508					T				606
GU722489		A							606
GU722452									606
GU722455					T				606
GU722497		A							606
GU722485	A				T				606
GU722513									606
AY146704	A				T				582

ภาพภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

	650	660	670	680	690	700	710	720
D26594	ACTGATTGGA	ATTCCCTTTT	CTGGATAGCC	CATCCCGGTG	GCCCTGCCAT	TTTGGACCAA	GTGGAATTGA	AGTTGCCCT
GU722476				T				686
GU722466				T				686
GU722451								686
GU722480				T				686
GU722479				T				686
GU722467				T				686
GU722463				T				686
GU722460				T				686
GU722491								686
GU722449				T				686
GU722510				T				686
GU722507				T				686
GU722506				T				686
GU722492				T				686
GU722486				T				686
GU722475				T				686
GU722474				T				686
GU722464				T				686
GU722456				T				686
GU722450				T				686
GU722511				T				686
GU722500				T				686
GU722499				T				686
GU722498				T				686
GU722496				T				686
GU722494				T				686
GU722481				T				686
GU722465				T				686
GU722461				T				686
GU722457				T				686
GU722503					G			686
GU722509				T				686
GU722488				T				686
GU722487				T				686
GU722483				T				686
GU722473				T				686
GU722472				T				686
GU722469				T				686
GU722468				T				686
GU722512				T				686
GU722504				T				686
GU722495	G			T				686
GU722493				T				686
GU722490				T				686
GU722477				T				686
GU722471				T				686
GU722454				T				686
GU722501				T				686
GU722482				T				686
GU722470				T				686
GU722462				T				686
GU722459				T				686
GU722448			T					686
GU722505				T				686
GU722484				T				686
GU722478				T				686
GU722508				T				686
GU722489				T				686
GU722452				T				686
GU722455				T				686
GU722497				T				686
GU722485				T				686
GU722513			T		A			686
AY146704				T				662

ภาพภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

	730	740	750	
D26594	TAAGCCCGAG	AAGCTTCGGG	CCACGAGACA	CGTGCTAA 758
GU722476				724
GU722466				724
GU722451				724
GU722480				724
GU722479				724
GU722467				724
GU722463				724
GU722460				724
GU722491				724
GU722449				724
GU722510				724
GU722507				724
GU722506				724
GU722492				724
GU722486				724
GU722475				724
GU722474				724
GU722464				724
GU722456				724
GU722450				724
GU722511				724
GU722500				724
GU722499				724
GU722498				724
GU722496				724
GU722494				724
GU722481				724
GU722465				724
GU722461				724
GU722457				724
GU722503				724
GU722509				724
GU722488				724
GU722487				724
GU722483				724
GU722473				724
GU722472				724
GU722469				724
GU722468				724
GU722512				724
GU722504				724
GU722495				724
GU722493				724
GU722490				724
GU722477				724
GU722471				724
GU722454				724
GU722501				724
GU722482				724
GU722470				724
GU722462				724
GU722459				724
GU722448				724
GU722505				724
GU722484				724
GU722478				724
GU722508				724
GU722489				724
GU722452				724
GU722455				724
GU722497				724
GU722485				724
GU722513				724
AY146704				700

ภาพภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

ภาคผนวก ข

แสดงขนาดของชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ จ-1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายใต้ยีน *Acil*

Sample no.	GenBank Accession no.	ของชาสกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
1	GU722500		13, 211, 264, 313	A ₁
2	GU722465		13, 211, 264, 313	A ₁
3	GU722469		13, 211, 264, 313	A ₁
4	GU722509		13, 211, 264, 313	A ₁
5	GU722483		13, 211, 264, 313	A ₁
6	GU722452		13, 211, 264, 313	A ₁
7	GU722460		13, 211, 264, 313	A ₁
8	GU722510		13, 211, 264, 313	A ₁
9	GU722492		13, 211, 264, 313	A ₁
10	GU722459		13, 211, 264, 313	A ₁
11	GU722501		13, 211, 264, 313	A ₁
12	GU722484		13, 211, 264, 313	A ₁
13	GU722478		13, 211, 264, 313	A ₁
14	GU722490		13, 211, 264, 313	A ₁
15	GU722487		13, 211, 264, 313	A ₁

ตารางที่ ข-1 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของสกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของจีโนม bp	รูปแบบ
16	GU722472	13, 211, 264, 313	A ₁
17	GU722495	13, 211, 264, 313	A ₁
18	GU722471	13, 211, 264, 313	A ₁
19	GU722473	13, 264, 524	A ₂
20	GU722477	13, 264, 524	A ₂
21	GU722504	13, 264, 524	A ₂
22	GU722482	13, 264, 524	A ₂
23	GU722499	13, 211, 264, 313	A ₁
24	GU722461	13, 211, 264, 313	A ₁
25	GU722494	13, 211, 264, 313	A ₁
26	GU722481	13, 211, 264, 313	A ₁
27	GU722475	13, 211, 264, 313	A ₁
28	GU722464	13, 211, 264, 313	A ₁

ตารางที่ ๗-1 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของพืชสกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
29	GU722474	13, 211, 264, 313	A ₁
30	GU722496	13, 211, 264, 313	A ₁
31	GU722456	13, 211, 264, 313	A ₁
32	GU722491	13, 211, 264, 313	A ₁
33	GU722493	13, 211, 264, 313	A ₁
34	GU722467	13, 211, 264, 313	A ₁
35	GU722479	13, 211, 264, 313	A ₁
36	GU722511	224, 264, 313	A ₃
37	GU722512	13, 264, 524	A ₂
38	GU722462	224, 264, 313	A ₃
39	GU722454	224, 264, 313	A ₃
40	GU722455	224, 264, 313	A ₃
41	GU722508	224, 264, 313	A ₃
42	GU722476	13, 35, 211, 229, 313	A ₄

ตารางที่ ๗-1 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของสายพันธุ์ <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
43	GU722480	13, 35, 211, 229, 313	A ₄
44	GU722451	13, 35, 211, 229, 313	A ₄
45	GU722466	13, 35, 211, 229, 313	A ₄
46	GU722507	211, 277, 313	A ₅
47	GU722506	13, 65, 146, 264, 313	A ₆
48	GU722458	13, 65, 146, 264, 313	A ₆
49	GU722486	13, 211, 264, 313	A ₁
50	GU722457	13, 65, 211, 248, 264	A ₇
51	GU722497	211, 277, 313	A ₅
52	GU722489	277, 524	A ₈
53	GU722505	13, 264, 524	A ₂
54	GU722448	13, 211, 264, 313	A ₁

ตารางที่ ข-1 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของชาสกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของจีโนม bp	รูปแบบ
55	GU722470	13, 211, 264, 313	A ₁
56	GU722468	13, 211, 264, 313	A ₁
57	AY146704	13, 211, 264, 313	A ₁
58	GU722485	13, 211, 264, 313	A ₁
59	GU722503	13, 211, 264, 313	A ₁
60	GU722463	13, 211, 264, 313	A ₁
61	GU722498	13, 211, 264, 313	A ₁
62	D26594	13, 35, 211, 229, 313	A ₄
63	GU722449	13, 264, 524	A ₂
64	GU722488	13, 264, 524	A ₂

ตารางที่ ๗-2 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายใต้การคัดเลือกด้วยเอนไซม์ *BbvI*

Sample no.	GenBank Accession no. ของสายพันธุ์ <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
1	GU722500	22, 76, 333, 370	B ₁
2	GU722465	22, 76, 333, 370	B ₁
3	GU722469	22, 76, 333, 370	B ₁
4	GU722509	22, 76, 333, 370	B ₁
5	GU722483	22, 76, 333, 370	B ₁
6	GU722452	22, 76, 333, 370	B ₁
7	GU722460	22, 76, 333, 370	B ₁
8	GU722510	22, 76, 333, 370	B ₁
9	GU722492	22, 76, 333, 370	B ₁
10	GU722459	22, 76, 333, 370	B ₁
11	GU722501	22, 76, 333, 370	B ₁
12	GU722484	22, 76, 333, 370	B ₁
13	GU722478	22, 76, 333, 370	B ₁
14	GU722490	22, 76, 333, 370	B ₁
15	GU722487	22, 76, 333, 370	B ₁

ตารางที่ ๗-2 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของสายพันธุ์ <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
16	GU722472	22, 76, 333, 370	B ₁
17	GU722495	22, 76, 333, 370	B ₁
18	GU722471	22, 76, 333, 370	B ₁
19	GU722473	22, 76, 333, 370	B ₁
20	GU722477	22, 69, 76, 301, 333	B ₂
21	GU722504	22, 69, 76, 301, 333	B ₂
22	GU722482	22, 69, 76, 301, 333	B ₂
23	GU722499	22, 76, 333, 370	B ₁
24	GU722461	22, 76, 333, 370	B ₁
25	GU722494	22, 76, 333, 370	B ₁
26	GU722481	22, 76, 333, 370	B ₁
27	GU722475	22, 76, 333, 370	B ₁
28	GU722464	22, 76, 333, 370	B ₁

ตารางที่ ข-2 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของยีนสกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของจีโนม bp	รูปแบบ
29	GU722474	22, 76, 333, 370	B ₁
30	GU722496	22, 76, 333, 370	B ₁
31	GU722456	22, 76, 333, 370	B ₁
32	GU722491	22, 76, 333, 370	B ₁
33	GU722493	22, 76, 333, 370	B ₁
34	GU722467	22, 76, 333, 370	B ₁
35	GU722479	22, 76, 333, 370	B ₁
36	GU722511	22, 76, 333, 370	B ₁
37	GU722512	22, 28, 69, 76, 301, 305	B ₃
38	GU722462	22, 28, 76, 305, 370	B ₄
39	GU722454	22, 76, 333, 370	B ₁
40	GU722455	22, 76, 333, 370	B ₁
41	GU722508	22, 76, 333, 370	B ₁
42	GU722476	22, 76, 333, 370	B ₁

ตารางที่ ๗-2 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของสายพันธุ์ <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
43	GU722480	22, 76, 333, 370	B ₁
44	GU722451	22, 76, 333, 370	B ₁
45	GU722466	22, 76, 333, 370	B ₁
46	GU722507	22, 76, 333, 370	B ₁
47	GU722506	76, 355, 370	B ₅
48	GU722458	22, 76, 333, 370	B ₁
49	GU722486	22, 76, 333, 370	B ₁
50	GU722457	22, 69, 76, 301, 333	B ₂
51	GU722497	22, 28, 76, 305, 370	B ₄
52	GU722489	22, 69, 76, 301, 333	B ₂
53	GU722505	22, 76, 333, 370	B ₁
54	GU722448	22, 76, 333, 370	B ₁

ตารางที่ ข-2 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของชาตกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
55	GU722470	22, 76, 333, 370	B ₁
56	GU722468	22, 76, 333, 370	B ₁
57	AY146704	22, 76, 333, 370	B ₁
58	GU722485	22, 76, 333, 370	B ₁
59	GU722503	22, 76, 333, 370	B ₁
60	GU722463	22, 76, 333, 370	B ₁
61	GU722498	22, 76, 333, 370	B ₁
62	D26594	22, 76, 333, 370	B ₁
63	GU722449	22, 69, 76, 301, 333	B ₂
64	GU722488	22, 44, 301, 333	B ₆

ตารางที่ ข-3 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *HpaII*

Sample no.	GenBank Accession no. ของสายพันธุ์ <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
1	GU722500	84, 177, 540	H ₁
2	GU722465	84, 177, 540	H ₁
3	GU722469	84, 177, 540	H ₁
4	GU722509	84, 177, 540	H ₁
5	GU722483	84, 177, 540	H ₁
6	GU722452	84, 177, 540	H ₁
7	GU722460	84, 177, 540	H ₁
8	GU722510	84, 177, 540	H ₁
9	GU722492	84, 177, 540	H ₁
10	GU722459	84, 177, 540	H ₁
11	GU722501	84, 177, 540	H ₁
12	GU722484	84, 177, 540	H ₁
13	GU722478	84, 177, 540	H ₁
14	GU722490	84, 177, 540	H ₁
15	GU722487	84, 177, 540	H ₁

ตารางที่ ข-3 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของชาตสกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
16	GU722472	84, 177, 540	H ₁
17	GU722495	84, 177, 540	H ₁
18	GU722471	84, 177, 540	H ₁
19	GU722473	84, 177, 540	H ₁
20	GU722477	84, 177, 540	H ₁
21	GU722504	84, 177, 540	H ₁
22	GU722482	84, 177, 540	H ₁
23	GU722499	84, 177, 245, 295	H ₂
24	GU722461	84, 177, 245, 295	H ₂
25	GU722494	84, 177, 245, 295	H ₂
26	GU722481	84, 177, 245, 295	H ₂
27	GU722475	84, 177, 245, 295	H ₂
28	GU722464	84, 177, 245, 295	H ₂

ตารางที่ ข-3 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของชาตูล <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
29	GU722474	84, 177, 245, 295	H ₂
30	GU722496	84, 177, 245, 295	H ₂
31	GU722456	84, 177, 245, 295	H ₂
32	GU722491	84, 177, 245, 295	H ₂
33	GU722493	84, 177, 245, 295	H ₂
34	GU722467	84, 177, 245, 295	H ₂
35	GU722479	84, 177, 245, 295	H ₂
36	GU722511	84, 177, 245, 295	H ₂
37	GU722512	84, 177, 245, 295	H ₂
38	GU722462	84, 177, 540	H ₁
39	GU722454	84, 177, 540	H ₁
40	GU722455	84, 177, 540	H ₁
41	GU722508	84, 177, 540	H ₁
42	GU722476	84, 177, 245, 295	H ₂

ตารางที่ ๗-3 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของลำดับ Camellia	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
43	GU722480	84, 177, 245, 295	H ₂
44	GU722451	84, 126, 169, 177, 245	H ₃
45	GU722466	84, 177, 245, 295	H ₂
46	GU722507	84, 177, 245, 295	H ₂
47	GU722506	84, 177, 245, 295	H ₂
48	GU722458	84, 177, 245, 295	H ₂
49	GU722486	84, 177, 245, 295	H ₂
50	GU722457	84, 177, 245, 295	H ₂
51	GU722497	84, 177, 540	H ₁
52	GU722489	177, 624	H ₄
53	GU722505	177, 311, 313	H ₅
54	GU722448	261, 504	H ₆

ตารางที่ ข-3 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no.	ของชาสกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
55	GU722470		261, 504	H ₆
56	GU722468		84, 143, 180, 317	H ₇
57	AY146704		84, 177, 540	H ₁
58	GU722485		84, 177, 540	H ₁
59	GU722503		84, 177, 540	H ₁
60	GU722463		84, 177, 245, 295	H ₂
61	GU722498		84, 177, 245, 295	H ₂
62	D26594		84, 126, 169, 177, 245	H ₃
63	GU722449		84, 177, 245, 295	H ₂
64	GU722488		84, 177, 540	H ₁

ตารางที่ ข-4 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*

Sample no.	GenBank Accession no.	ของชาตฤๅถ <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
1	GU722500		242, 559	R ₁
2	GU722465		242, 559	R ₁
3	GU722469		242, 559	R ₁
4	GU722509		242, 559	R ₁
5	GU722483		242, 559	R ₁
6	GU722452		242, 559	R ₁
7	GU722460		242, 559	R ₁
8	GU722510		242, 559	R ₁
9	GU722492		242, 559	R ₁
10	GU722459		242, 559	R ₁
11	GU722501		242, 559	R ₁
12	GU722484		242, 559	R ₁
13	GU722478		242, 559	R ₁
14	GU722490		242, 559	R ₁
15	GU722487		242, 559	R ₁

ตารางที่ ๗-4 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของชาสกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของจีนดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
16	GU722472	242, 559	R _i
17	GU722495	242, 559	R _i
18	GU722471	242, 559	R _i
19	GU722473	242, 559	R _i
20	GU722477	242, 559	R _i
21	GU722504	242, 559	R _i
22	GU722482	242, 559	R _i
23	GU722499	242, 559 *ไม่มีตำแหน่งตัด	R _i
24	GU722461	242, 559	R _i
25	GU722494	242, 559	R _i
26	GU722481	242, 559	R _i
27	GU722475	242, 559	R _i
28	GU722464	242, 559	R _i

ตารางที่ ๗-4 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของสกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของจีโนม bp	รูปแบบ
29	GU722474	242, 559	R ₁
30	GU722496	242, 559	R ₁
31	GU722456	242, 559	R ₁
32	GU722491	242, 559	R ₁
33	GU722493	242, 559	R ₁
34	GU722467	242, 559	R ₁
35	GU722479	242, 559	R ₁
36	GU722511	242, 559	R ₁
37	GU722512	242, 559	R ₁
38	GU722462	242, 559	R ₁
39	GU722454	242, 559	R ₁
40	GU722455	242, 559	R ₁
41	GU722508	242, 559	R ₁
42	GU722476	242, 559	R ₁

ตารางที่ ๗-4 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของสายพันธุ์ <i>Camellia</i>	ขนาดของจีโนม bp	รูปแบบ
43	GU722480	69, 173, 559	R ₂
44	GU722451	69, 173, 559	R ₂
45	GU722466	69, 173, 559	R ₂
46	GU722507	242, 559	R ₁
47	GU722506	242, 559	R ₁
48	GU722458	242, 559	R ₁
49	GU722486	69, 173, 559	R ₂
50	GU722457	242, 559	R ₁
51	GU722497	242, 559	R ₁
52	GU722489	242, 559	R ₁
53	GU722505	242, 559	R ₁
54	GU722448	242, 559	R ₁

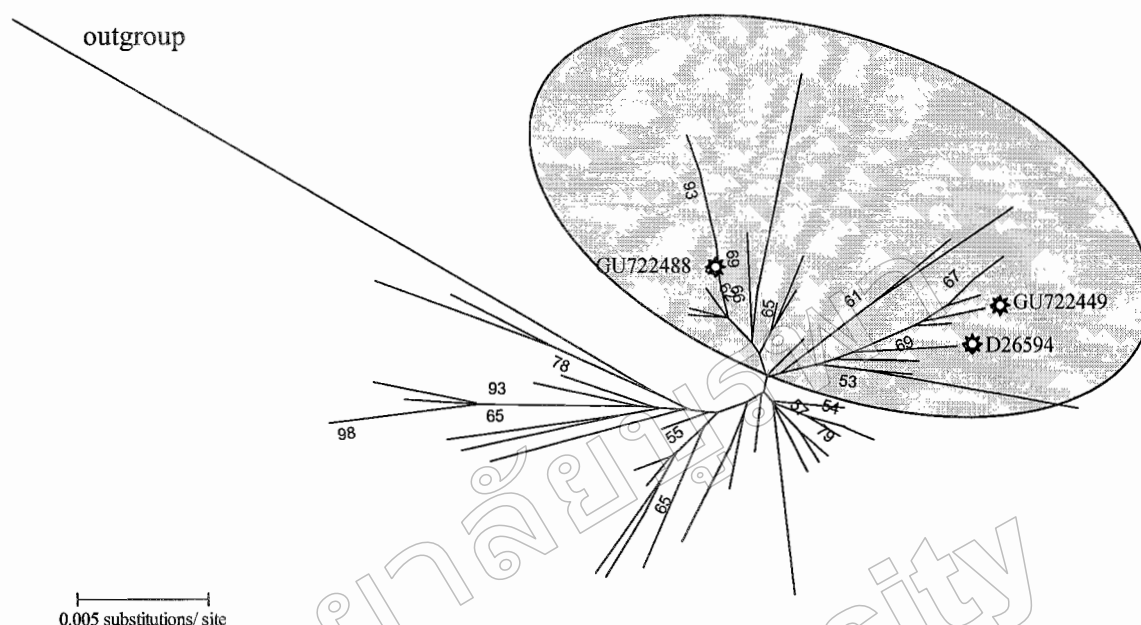
ตารางที่ ข-4 (ต่อ)

Sample no.	GenBank Accession no. ของชาตกุล <i>Camellia</i>	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ bp	รูปแบบ
55	GU722470	242, 559	R ₁
56	GU722468	242, 559	R ₁
57	AY146704	37, 242, 522	R ₃
58	GU722485	242, 559	R ₁
59	GU722503	242, 559	R ₁
60	GU722463	242, 559	R ₁
61	GU722498	242, 559	R ₁
62	D26594	37, 242, 522	R ₃
63	GU722449	69, 173, 559	R ₂
64	GU722488	242, 559	R ₁

ภาคผนวก ก

แผนภาพ Phylogenetic tree ของชาสกุล *Camellia* ทั้ง 64 ข้อมูลด้วยวิธี Neighbor-joining

โมเดล Maximum Composite Likelihood



ภาพภาคผนวก ก-1 Phylogenetic tree ในส่วนของยีน *ChS* ของชาสกุล *Camellia* จำนวน 64 ข้อมูล
 บนฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) คือ *Pyrenaria
 menglaensis* (GU722513) สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 5.1 วิธี Neighbor-
 joining โมเดล Maximum Composite Likelihood; * = ชนิดของชาที่ปลูกใน
 ภาคเหนือของประเทศไทย; GU722488 = ชาน้ำมัน *C. oleifera*, GU722449 =
 ชาอัสสัม *C. sinensis* var. *assamica* และ D26594 = ชาจีน *C. sinensis*

หมายเหตุ ค่าของตัวเลขที่ปรากฏบนกิ่งแสดงการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

ภาคผนวก ง

เอกสารประกอบการเผยแพร่วิทยานิพนธ์

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Chalcone synthase*

DNA fingerprinting of the genus *Camellia* based on partial sequences of *Chalcone synthase*

จิตรอนงค์ คำรัส¹ และ ชุตตา บุญภักดี^{1*}

Jitanong Khamros¹ and Chuta Boonphakdee^{1}*

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี 20131

¹Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

* Corresponding author: chuta@buu.ac.th

บทคัดย่อ

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 *Acil*, *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. oleifera*) ออกจากกันได้

Abstract

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 *Acil*, *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.

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

Keywords: DNA fingerprint, *Camellia*, *ChS*, *Chalcone synthase*, RFLP

บทนำ

ชาสกุล *Camellia* เป็นชาติที่มีความหลากหลายของชนิด พบประมาณ 120 ชนิด กระจายอยู่ในประเทศแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น ภูฏาน จีน อินเดีย และไทย เป็นต้น โดยพบมากที่สุดในประเทศจีนประมาณ 97 ชนิด (Shu, 2007) ผลผลิตชาทั่วโลกในปี พ.ศ. 2555 มีประมาณ 3.8 ล้านตัน สำหรับประเทศไทยมีการผลิตชาร้อยละ 0.2 ของปริมาณการผลิตชาทั้งหมดในตลาดโลก ในปี พ.ศ. 2555 มีผลผลิตใบชาสดรวม 40,847 ตัน โดยจังหวัดเชียงรายมีการเพาะปลูกและได้ผลผลิตมากที่สุด (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) และในปัจจุบันการบริโภคชาเพื่อสุขภาพกำลังได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นสาเหตุประการหนึ่งมาจากสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิในใบชา คือคาเทชินที่มีมากที่สุดใบชอนั้นมีสรรพคุณทางยาโดยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง และสารต้านความดันโลหิตสูง (Adrian and Bolwell, 2000) เป็นต้น ดังนั้นจึงมีผลิตภัณฑ์ชา เช่น ชาห่อ ชาผง ชาผสมสมุนไพร หลากชนิดวางขายในท้องตลาด ซึ่งการตรวจสอบการระบุชนิดของชาตามที่ปรากฏบนฉลากสินค้าโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียวย่อมเป็นไปได้ยาก

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวโมเลกุลถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการดั่งกล่าวในผลิตภัณฑ์จากสัตว์และพืชหลายชนิด เทคนิคที่นิยมใช้ เช่น PCR (Polymerase Chain Reaction) สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากที่มีปริมาณน้อยและจากเนื้อเยื่อที่เสียหายได้ ซึ่งข้อความพันธุกรรมบางบริเวณสามารถนำไปใช้บ่งชี้ชนิดสิ่งมีชีวิตและผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปได้อย่างจำเพาะ ปัจจุบันมีข้อมูลพันธุกรรมของพืชที่ศึกษาและบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank จำนวนมาก ดังนั้นการพิจารณาใช้ประโยชน์จากชีวสารสนเทศศาสตร์ จัดการข้อมูลก่อนปฏิบัติการทดลองจริง โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Chalcone synthase (ChS)* ที่มีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์ phenylpropanoids และกระบวนการป้องกันการถูกทำลายโดยรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงอาทิตย์ของชาสกุล *Camellia* ที่มีการบันทึกไว้มาจำลองเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอเอกลักษณ์ในระดับชนิดหรือสายพันธุ์ของชา และเน้นชนิดที่มีการปลูกอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ ชาฮัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) ชาจีน (*C. sinensis*) และชาน้ำมัน (*C. oleifera*) โดยหาความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนยีน *ChS* เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอย่อยด้วยเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ที่สามารถตรวจสอบได้บนเจลอะกาโรส ทำให้ลดความผิดพลาด และลดค่าใช้จ่ายสำหรับการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการในลำดับขั้นต่อไป

วิธีการศึกษา

นำข้อมูลลำดับเบสบริเวณยีน *ChS* จากฐานข้อมูล GenBank ของชาสกุล *Camellia* จำนวน 64 ข้อมูล ณ เดือน มีนาคม พ.ศ. 2555 รวมชนิดที่พบว่าปลูกอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย คือ ชาจีน *C. sinensis* (GenBank accession no. D26594) ชาฮัสสัม *C. sinensis* var. *assamica* (GU722449) และชาน้ำมัน *C. oleifera* (GU722488) กำหนดบริเวณยีนที่ศึกษาที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิค PCR จากคู่มือที่ออกแบบในส่วนของการทดลองที่ 2 (GenBank Accession no. D26594; Kaundun and Matsumoto, 2003) และทดสอบนำร่องในห้องปฏิบัติการได้ผลผลิตขนาด 768 คู่เบส โดยนำข้อมูลบริเวณที่กำหนดมาเทียบเคียงความเหมือนด้วยโปรแกรม ClustalX version 2.0.11 วิเคราะห์และเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกันของชาแต่ละตัวอย่าง และศึกษาความสัมพันธ์โดยนำข้อมูลมาทำ Phylogenetic tree ด้วย

โปรแกรม MEGA 5.1 สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โมเดล Kimura-2-parameter โดยสับเปลี่ยนข้อมูล (bootstrap) 1,000 ครั้ง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

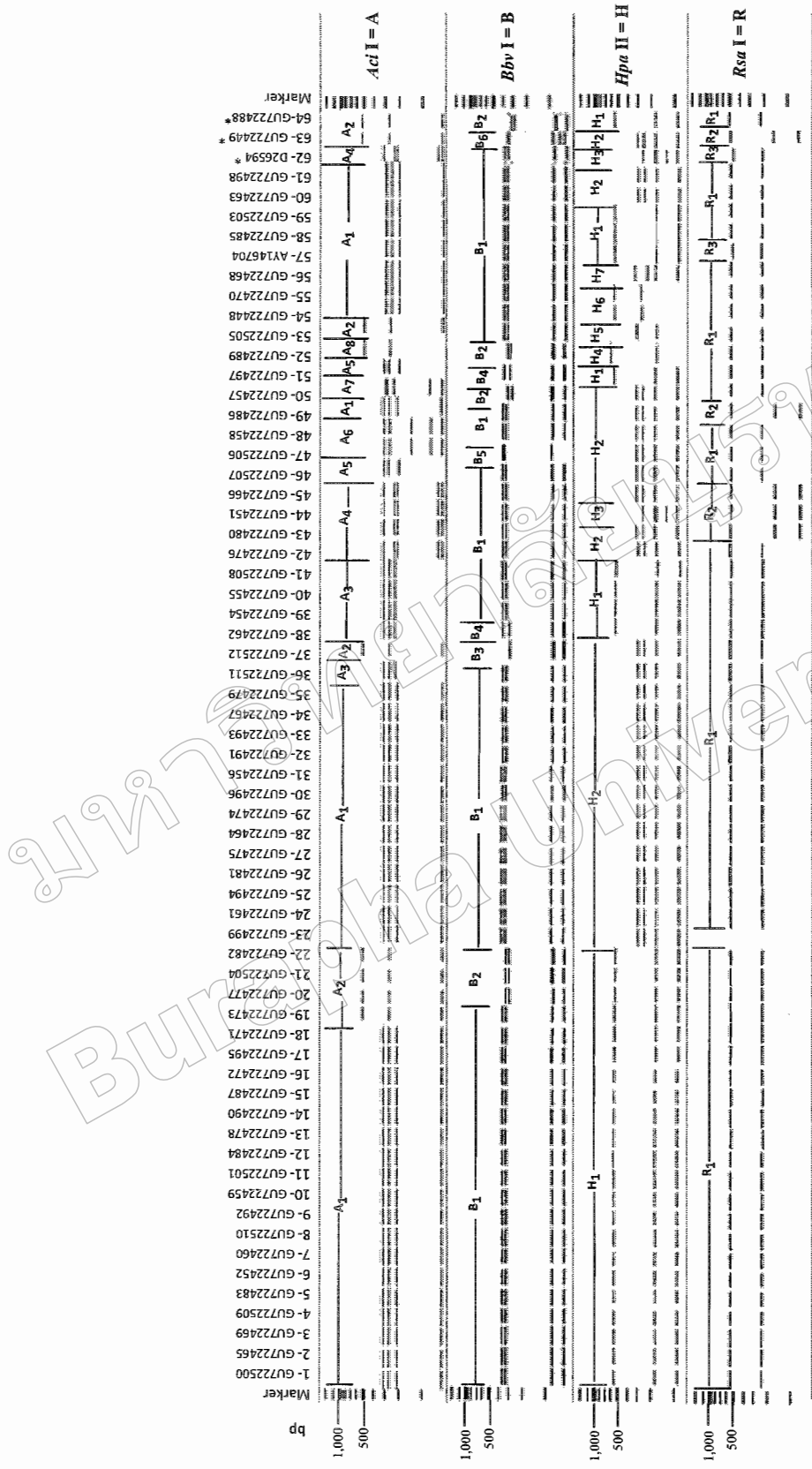
เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชาบริเวณยีน *ChS* ที่ศึกษามาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acil*, *BbvI*, *HpaII* และ *RsaI* ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด 8, 6, 7 และ 3 รูปแบบ ตามลำดับ (รูปที่ 1; $Acil = A_{1-8}$; $BbvI = B_{1-6}$; $HpaII = H_{1-7}$ และ $RsaI = R_{1-3}$ ตามลำดับ) ถ้าพิจารณาเฉพาะชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทยจะพบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วย *Acil* สามารถระบุเอกลักษณ์ของชาจีน (62-D26594) เป็นรูปแบบ A_4 ที่มีขึ้นดีเอ็นเอย่อยขนาด 13, 35, 211, 229, 313 คู่เบส แต่ไม่สามารถแยกชาอัสสัม (63-GU722449) และชาน้ำมัน (64-GU722488) ออกจากกันได้ เมื่อใช้เอนไซม์ *BbvI* พบว่าจัดกลุ่มชาได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม และแยกชาอัสสัมและชาน้ำมันออกจากกัน คือ รูปแบบ B_6 และ B_2 ขึ้นดีเอ็นเอย่อยมีขนาด 22, 44, 301, 333 และ 22, 69, 76, 301, 333 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อพิจารณาใช้เอนไซม์ *HpaII* จะสามารถแยกชาออกเป็น 7 กลุ่ม (H_1 - H_7) แยกความแตกต่างของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากกัน กล่าวคือ ปรากฏรูปแบบ H_3 (84, 177, 245, 295), H_2 (84, 126, 169, 177, 245) และ H_1 (84, 177, 540) ตามลำดับ เช่นเดียวกับเอนไซม์ *RsaI* ที่สามารถแยกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากกันได้เช่นกัน ปรากฏรูปแบบ R_3 (242, 522), R_2 (69, 173, 559) และ R_1 (242, 559) ตามลำดับ

แต่ทั้งนี้การใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวตัดในส่วนที่ยีน *ChS* นั้นไม่สามารถแยกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากชาชนิดอื่นได้ เช่น *HpaII* แยกชาจีนออกจากชาอัสสัมและชาน้ำมัน (H_3) ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับของชา *C. atrothea* (44-GU722451) แต่ถ้าพิจารณารูปแบบที่เกิดจากเอนไซม์ทั้งสี่ชนิดจะพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 27 รูปแบบ จำแนกชาได้ 18 ชนิด และ 4 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน รวมถึงสามารถจำแนกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันได้ ($A_4B_1H_3R_3$, $A_2B_6H_2R_2$, $A_2B_2H_1R_1$ ตามลำดับ) สอดคล้องกับการศึกษาของ Matsumoto et al. (2002) ใช้เทคนิค PCR-RFLP จำแนกชาเขียวญี่ปุ่น (*yama-cha*; *C. sinensis*) โดยศึกษาในส่วนที่ยีน PAL (Phenylalanine ammonia-lyase) ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *EcoRV* สามารถจำแนกชาเขียวญี่ปุ่นที่เป็นสายพันธุ์พื้นเมืองกับสายพันธุ์ลูกผสมออกจากกัน และจัดชาเขียวญี่ปุ่นไว้ต่างกลุ่มจากชาสายพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีนด้วยแผนผัง Phylogenetic tree เช่นเดียวกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Phylogenetic tree พบว่าแยกชาน้ำมันออกจากชาอัสสัมและชาจีนอย่างชัดเจน และชาอัสสัมอยู่ต่างคลดย่อยกับชาจีน (รูปที่ 2) สอดคล้องกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาจากเทคนิค PCR-RFLP ดังกล่าวมาข้างต้น

ผลการวิจัยด้วยเทคนิค PCR-RFLP บริเวณยีน *ChS* ครั้งนี้จะสามารถนำไปศึกษาต่อได้ในห้องปฏิบัติการที่วิเคราะห์ผลด้วยเจลอะกาโรส จะสามารถระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของชาได้ ทำให้นัยยะเวลา และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีการอ่านลำดับเบส (sequencing) ทั้งหมด

สรุปผลการศึกษา

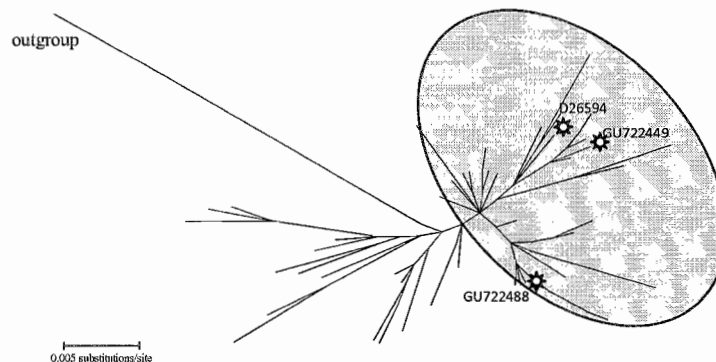
สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* จากข้อมูลที่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank โดยวิเคราะห์ในส่วนที่ยีน *ChS* ขนาด 768 คู่เบส ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acil*,



รูปที่ 1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* ในส่วนของยีน *ChS* ตัดด้วยเอนไซม์ *AcI*, *BbvI*, *HpaI* และ *RsaI* บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 % เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder; * = ชนิดของชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย: GU722488 = ชาฉำฉ *C. oleifera*, GU722449 = ชาอัสสัม *C. sinensis* var. *assamica* และ D26594 = ชาจีน *C. sinensis*

การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18 ในหัวข้อ “พันธุศาสตร์ก้าวหน้าสู่อาเซียน”
โรงแรมแอมบาสเดอร์ กรุงเทพมหานคร

วันที่ 17-19 กรกฎาคม 2556



รูปที่ 2 Phylogenetic tree ในส่วนของยีน *ChS* ของชาสกุล *Camellia* จำนวน 64 ข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) คือชา *Pyrenaria menglaensis* (GU722513) สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 5.1 วิธี Maximum Likelihood โมเดล Kimura-2 parameter; * = ชนิดของชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย; GU722488 = ชาน้ำมัน *C. oleifera*, GU722449 = ชาฮัสสัม *C. sinensis* var. *assamica* และ D26594 = ชาจีน *C. sinensis*

BbvI, *HpaII* และ *RsaI* ปรากฏลายพิมพ์ทั้งหมด 27 รูปแบบ ที่สามารถบ่งชี้ชนิดและสายพันธุ์ของชาได้โดยเฉพาะชาจีน ชาฮัสสัม และชาน้ำมัน ที่มีการปลูกอยู่ในภาคเหนือของประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการส่งเสริมครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สนับสนุนทุนการศึกษาแก่ จิตรอนงค์ คำวงศ์ และงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สนับสนุนทุนการนำเสนองานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2555. เอกสารสถิติการเกษตร. 2555. 167-168.

Adrian JP, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man: the potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food. Agric.* 2000;80:985-1012.

Kaundun SS, Matsumoto S. Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in Tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between *assamica* and *sinensis* varieties. *Theor Appl Genet.* 2003; 106:375-383.

Matsumoto S, Kiriwa Y, Takeda Y. Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA. *Theor Appl Genet.* 2002;104:998-1002.

Shu SC. *Camellia Linnaeus*. *Flora of China*. 2007;12:367-412.