บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ข้อมูลของยีน *ChS* ของชาสกุล *Camellia*

จากการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ChS* ของชาสกุล *Camellia* บนฐานข้อมูล GenBank เมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2555 พบจำนวน 64 ข้อมูล รวมข้อมูลของตัวอย่างชาที่พบว่าปลูกในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ ชาจีน (*C. sienesis*; GenBank Accession no. D26594) ชาอัสสัม (*C. sinensis* var. *assamica*; GU722449) และชาน้ำมัน (*C. oleifera*; GU722488)

ในลำดับแรกทำการบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของชาสกุล *Camellia* แต่ละข้อมูลในรูปแบบ FASTA ดังแสดงในภาพที่ 4-1 (แสดงเพียง 1 ตัวอย่าง คือข้อมูลของชาจีน; GenBank accession no. D26594 ที่มีความยาวทั้งหมด 1,405 คู่เบส) พิจารณาเลือกใช้บริเวณของยีน *ChS* ที่ศึกษาโดยกำหนดจากตำแหน่งของไพรเมอร์ด้านซ้าย (5'-AAACCCAAATGTGTG TGCCTAC-3') และด้านขวา (5'-AGGATAAACAACACACAAGCG C-3') (แสดงบางส่วนในภาพที่ 4-2 ในตำแหน่งที่ 13 ถึงตำแหน่งที่ 780 ของข้อมูล) จากนั้นปฏิบัติเช่นเดียวกันกับทุกข้อมูลที่นำมาศึกษาที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลผลิตขนาด 768 คู่เบส กับชาตัวอย่างจริงในห้องปฏิบัติการ (ชูตา บุญภักดี; ติดต่อส่วนตัว)

> D26594 *Camellia sinensis*
GCCGACTACCAGCTCACCACCACCGCACACGGTGTCTCTCCGCCCCCTGTGAATTTCTTTCTCCGGCGAAGATGGTGACAGTGGAG
GAAGTGAGGAGGGCACAGAGGGCCGAGGGACCCGCGACGGTGATGGCGATCGGGACGGCGACTCCGCCCAACTGCGTTGATCAGAG
CACGTACCCAGATTACTACTTCCGCATTACTAACAGCGAGCATAAAACGGAGTTGAAAGAGAAGTTTCAGCGCATGTGTGACAAGT
CCATGATTAAGAAGAGGTATATGTATTTGACAGAGGAAATTTTAAAAGAAAACCCAAATGTGTGTGCCTACATGGCACCTTCACTG
GATGCTAGGCAAGACATGGTGGTTGTTGAAGTCCCAAAACTAGGCAAAGAGGCTGCAACCAAGGCCATCAAAGAATGGGGCCAGCC
GAAGTCCAAAATCACCCACTTGGTTTTCTGCACCACTAGTGGCGTCGACATGCCCGGGGCCGATTACCAACTCACCAAGCTCCTCG
GTCTCCGTCCCTCTGTCAAGCGGCTCATGATGTACCAACAAGGTTGCTTTGCCGGCGGCACCGTGCTCCGCCTAGCCAAAGACCTA
GCTGAGAACAACAAAGGTGCTCGGGTCCTAGTTGTGTGTTCGGAAATCACTGCAGTCACCTTCCGTGGGCCTAGTGATGCCCATCT
TGATAGCCTTGTGGGCCAGGCCCTATTTGGTGACGGTGCAGCTGCTATTATAGTTGGGTCAGACCCAATTCCCGAGGTTGAGAAGC
CGTTGTTTGAGTTGGTCTCAGCGGCTCAAACCATCCTCCCGGACAGCGATGGTGCTATCGATGGGCATCTTCGTGAAGTGGGCCTT
ACATTCCATCTCCTCAAGGATGTTCCTGGGCTTATTTCCAAGAACATAGAGAAGAGTCTAAATGAGGCATTCCAACCCTTGAACAT
CACTGATTGGAATTCCCTTTTCTGGATAGCCCATCCCGGTGGCCCTGCCATTTTGGACCAAGTGGAATTGAAGTTGGCCCTTAAGC
CCGAGAAGCTTCGGGCCACGAGACACGTGCTAAGTGAGTACGGCAACATGTCCAGCGCTTGTGTGTTGTTTATCCTAGATGAGATG
AGAAAGAGTTCAGCAAAGAAAGGACTCAAGACCACTGGTGAGGGGCTCGACTGGGGTGTGCTCTTTGGGTTCGGACCAGGGCTCAC
CGTTGAGACTGTGGTGCTACATAGCGTGTCTACTTAATTTTAAAATGTTGCTCTATCATTGAACTACGTTGTAGTGAGGTCTTTTT
TTTTTAATGTGTGATTGTGTTGGTTTTTATTTGGTTCCACTTTGCTTTGGTTGTTTGCATTTTGTAATGATACTCATGCAGTGAAT
TAAAATTTAAATAATATATGTTTCTTGTG

ภาพที่ 4-1 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ChS* ในรูปแบบ FASTA ของชาจีน *Camellia sinensis* (GenBank accession no. D26594)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131


```
   1 AAACCCAAATGTGTGTGCCTACATGGCACCTTCACTGGATGCTAGGCAAGACATGGTGGT
             >>>>>>>>>>>>>>>>>>>  *************************
  61 TGTTGAAGTCCCAAAACTAGGCAAAGAGGCTGCAACCAAGGCCATCAAAGAATGGGGCCA
     ************************************************************
 121 GCCGAAGTCCAAAATCACCCACTTGGTTTTCTGCACCACTAGTGGCGTCGACATGCCCGG
     ************************************************************
 181 GGCCGATTACCAACTCACCAAGCTCCTCGGTCTCCGTCCCTCTGTCAAGCGGCTCATGAT
     ************************************************************
 241 GTACCAACAAGGTTGCTTTGCCGGCGGCACCGTGCTCCGCCTAGCCAAAGACCTAGCTGA
     ************************************************************
 301 GAACAACAAAGGTGCTCGGGTCCTAGTTGTGTGTTCGGAAATCACTGCAGTCACCTTCCG
     ************************************************************
 361 TGGGCCTAGTGATGCCCATCTTGATAGCCTTGTGGGCCAGGCCCTATTTGGTGACGGTGC
     ************************************************************
 421 AGCTGCTATTATAGTTGGGTCAGACCCAATTCCCGAGGTTGAGAAGCCGTTGTTTGAGTT
     ************************************************************
 481 GGTCTCAGCGGCTCAAACCATCCTCCCGGACAGCGATGGTGCTATCGATGGGCATCTTCG
     ************************************************************
 541 TGAAGTGGGCCTTACATTCCATCTCCTCAAGGATGTTCCTGGGCTTATTTCCAAGAACAT
     ************************************************************
 601 AGAGAAGAGTCTAAATGAGGCATTCCAACCCTTGAACATCACTGATTGGAATTCCCTTTT
     ************************************************************
 661 CTGGATAGCCCATCCCGGTGGCCCTGCCATTTTGGACCAAGTGGAATTGAAGTTGGCCCT
     ************************************************************
 721 TAAGCCCGAGAAGCTTCGGGCCACGAGACACGTGCTAAGTGAGTACGGCAACATGTCCAG
     ********************************** <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
 781 CGCTTGTGTGTTGTTTATCCT

KEYS (in order of precedence):
******target
>>>>>> left primer   GTGTGCCTACATGGCACCTT
<<<<<< right primer  CTGGACATGTTGCCGTACTC
```

ภาพที่ 4-2 บริเวณของยีน *ChS* ที่ศึกษาในครั้งนี้ของชาจีน (*C. sienesis*; GenBank accession no. D26594) กำหนดโดยตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ (left primer และ right primer)

4.2 การจำลองรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ

ทำการเทียบเคียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชาสกุล *Camellia* จำนวน 64 ข้อมูล โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 2.0.11 ดังแสดงในภาพภาคผนวก ก-1 พบว่ามีลำดับเบสแตกต่างกันจำนวน 97 คู่เบส จากทั้งหมด 768 คู่เบส ที่นำมาวิเคราะห์คิดเป็นร้อยละ 12.63 เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ สามารถคัดเลือกเอนไซม์ได้ 4 ชนิด คือ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I ที่แสดงในภาพภาคผนวก ก-1 ที่มีตำแหน่งจดจำดังตารางที่ 4-1 และตารางที่ ข-1 ถึง ข-4

323064

ตารางที่ 4-1 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลของชาสกุล *Camellia*

ชนิดเอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งจดจำ (5'-3')
*Aci*I	C'CG_C หรือ G'CG_G
*Bbv*I	GCAGCNNNNNNNN'NNNN_
*Hpa*II	C'CG_G
*Rsa*I	GT'AC

หมายเหตุ A = Adenine, C = Cytosine, T = Thymine, G = Guanine และ N = A, T, C, G

ภายหลังวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดบนลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกข้อมูลแล้วทำการสร้างไดอะแกรมจำลองรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัดของชาทั้ง 64 ข้อมูลบนเจลอะกาโรสหลังทำอิเล็กโทรโฟริซีส ที่ความเข้มข้นของเจล 1.0% เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (Marker; ภาพที่ 4-3) โดยนำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* แต่ละชนิดหรือสายพันธุ์มาเปรียบเทียบกัน วิเคราะห์ขนาดและความแตกต่างกันของรูปแบบแถบดีเอ็นเอในชาแต่ละข้อมูลเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และพิจารณารูปแบบที่เกิดจากการใช้เอนไซม์ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ*Rsa*I ทั้ง 4 เอนไซม์ ร่วมกันด้วย ภายหลังการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดดังกล่าวข้างต้นที่ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด 8, 6, 7 และ 3 รูปแบบตามลำดับ (ภาพที่ 4-3) ปรากฏเป็นรูปแบบ $A_{1\text{-}8}$, $B_{1\text{-}6}$, $H_{1\text{-}7}$ และ $R_{1\text{-}3}$ตามลำดับ ซึ่งรายละเอียดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอย่อยภายหลังตัดด้วยเอนไซม์แต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 4-2

เมื่อพิจารณาเฉพาะชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันจะพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ *Aci*I เพียงอย่างเดียวสามารถระบุเอกลักษณ์ของชาจีนได้ (ภาพที่ 4-3, 4-4; 62-D26594) ปรากฏรูปแบบ A_4 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอย่อยขนาด 13, 35, 211, 229 และ 313 คู่เบส แต่ไม่สามารถแยกชาอัสสัม (63-GU722449) และชาน้ำมัน (64-GU722488) ออกจากกันได้ นอกจากนี้จะสามารถระบุความเป็นเอกลักษณ์ของชา *C. cordifolia* (50-GU722457) และ *C. pachysandra* (52-GU722487) ได้ ปรากฏรูปแบบ A_7 และ A_8 ตามลำดับ แต่ยังไม่สามารถแยกชาตัวอย่างอื่น เช่น ชา *C. costei* (48-GU722458) ที่มีรูปแบบเดียวกันกับ *C. euryoides* var. *nokoensis* (49-GU722486) คือรูปแบบ A_6 จึงพิจารณาใช้เอนไซม์ชนิดที่ 2 คือ *Rsa*I ทำให้เกิดรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของชาทั้งสองชนิดสามารถแยกชา *C. costei* และ *C. euryoides* var. *nokoensis* ออกจากกันได้ ปรากฏรูปแบบ R_1 และ R_2 ตามลำดับ

เมื่อใช้เอนไซม์ *Bbv*I ตัดบริเวณยีน *ChS* พบว่าสามารถจัดกลุ่มชาทั้งหมดออกเป็น 6 กลุ่ม (B_1-B_6) ที่จำแนกชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากกัน คือ รูปแบบ B_6 และ B_2 (ภาพที่ 4-3, 4-5) ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 22, 44, 301, 333 และ 22, 69, 76, 301, 333 คู่เบส ตามลำดับ และจำแนกชา *C. yunnanensis* (37-GU722512), *C. transnokoensis* (47-GU722506) และ *C. sinensis* var. *assamica* (63-GU722449) ออกจากกันปรากฏรูปแบบที่เป็นเอกลักษณ์ B_3, B_5 และ B_6 ตามลำดับ แต่ยังไม่สามารถแยกชาตัวอย่างอื่น เช่น *C. euphlebia* (38-GU722462) กับ *C. pyxidiacea* var. *rubituberculata* (51-GU722497) ที่ปรากฏรูปแบบ B_4 จึงพิจารณาใช้เอนไซม์ชนิดที่ 2 ตัด คือ เอนไซม์ *Aci*I จึงสามารถแยกชา *C. euphlebia* กับ *C. pyxidiacea* var. *rubituberculata* ปรากฏรูปแบบ A_3 และ A_5 ตามลำดับ

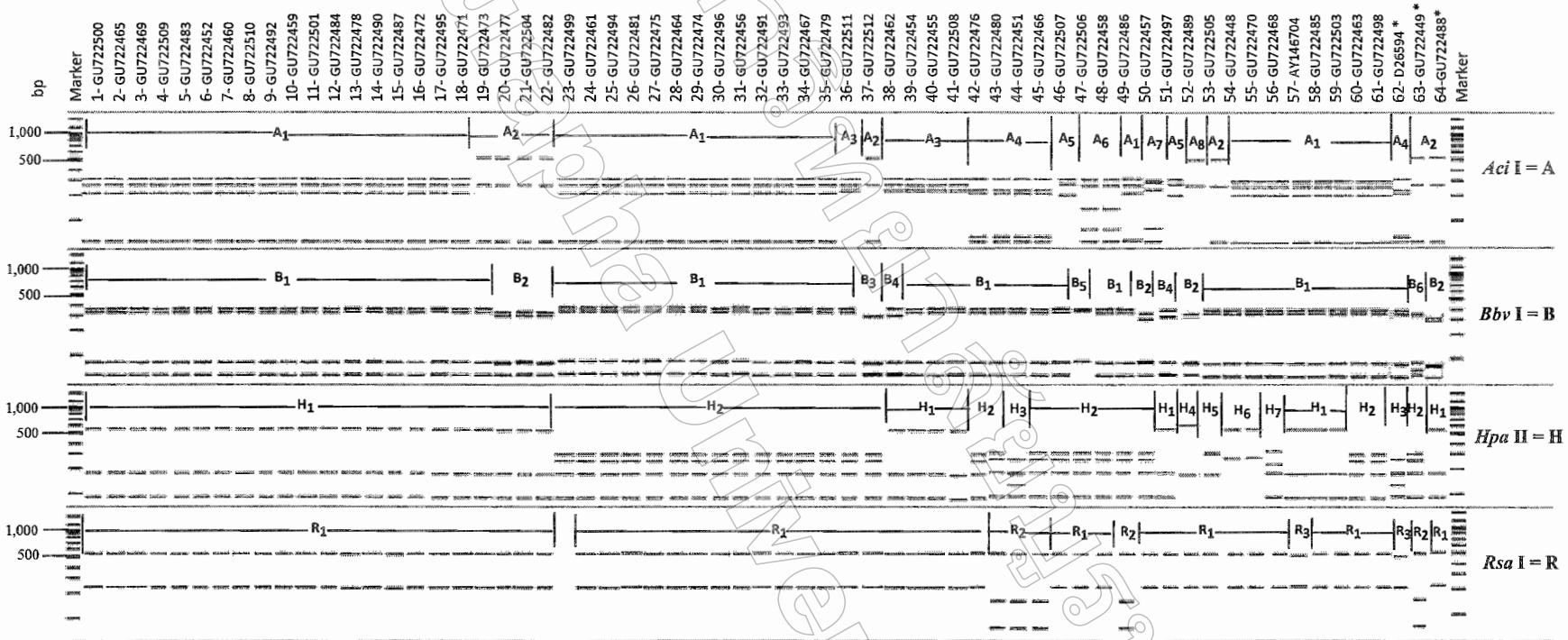
เมื่อพิจารณาเลือกใช้เอนไซม์ *Hpa*II สามารถแยกสายพันธุ์ของชาออกเป็น 7 กลุ่ม โดยแยกความแตกต่างของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากกัน กล่าวคือ ปรากฏรูปแบบ H_3 (84, 177, 245, 295 คู่เบส), H_2 (84, 126, 169, 177, 245 คู่เบส) และ H_1 (84, 177, 540 คู่เบส) (ภาพที่ 4-3, 4-6) ตามลำดับ และจำแนกชา *C. pachysandra* (52-GU722489), *C. transarisanensis* (53-GU722505) และ *C. furfuracea* (56-GU722468) ออกจากชาอื่นได้ ปรากฏรูปแบบ H_4, H_5 และ H_7 ตามลำดับ แต่ยังไม่สามารถแยกชาตัวอย่างอื่น เช่น *C. atrothea* (GU722451) และ *C. sinensis* (D26594) ที่ปรากฏรูปแบบ H_3 จึงพิจารณาใช้เอนไซม์ชนิดที่ 2 คือ *Rsa*I สามารถแยก *C. atrothea* และ *C. sinensis* ออกจากกัน ปรากฏรูปแบบ R_2 และ R_3 ตามลำดับ

เมื่อใช้เอนไซม์ *Rsa*I สามารถแยกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากกันได้ โดยปรากฏรูปแบบ R_3 (242, 522 คู่เบส), R_2 (69, 173, 559 คู่เบส) และ R_1 (242, 559 คู่เบส) (ภาพที่ 4-3, 4-7) ตามลำดับ ไม่พบรูปแบบที่เป็นเอกลักษณ์ที่สามารถจำแนกชาตัวอย่างอื่นได้และเมื่อพิจารณารูปแบบที่เกิดจากการใช้เอนไซม์ทั้งสี่ชนิดรวมกันปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 27 รูปแบบ จำแนกชาได้ 18 ชนิด และ 4 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน รวมถึงสามารถจำแนกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ($A_4B_1H_3R_3$, $A_2B_6H_2R_2$ และ $A_2B_2H_1R$ ตามลำดับ) ออกจากกันได้ แต่ทั้งนี้พบว่ายังไม่สามารถจำแนกชากลุ่มใหญ่ ในภาพที่ 4-8 (1-GU722500, 2-…, 18-GU722471) ออกจากกันได้

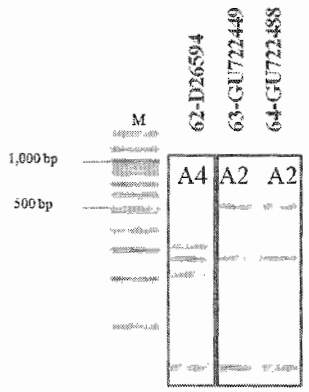
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Phylogenetic tree

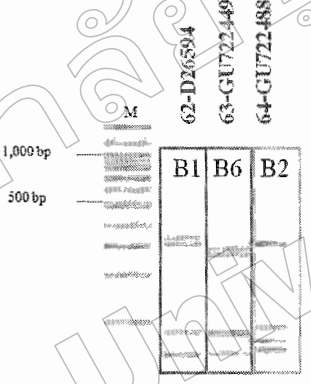
เมื่อทำการสร้าง Phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChS* ทั้งหมดจำนวน 64 ข้อมูล และใช้ตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) 1 ชนิด คือพืชในวงศ์ Teaceae ชนิด *Pyrenaria menglaensis* ผลจากการวิเคราะห์เบื้องต้นของโปรแกรม MEGA ver. 5.1 ทำให้เลือกใช้วิธีทางสถิติที่เหมาะสม คือ Maximum likelihood โมเดล Kimura 2-parameter สำหรับการสร้าง Phylogenetic tree ผลการทดลองพบว่าชาทั้ง 64 ข้อมูล สามารถแบ่งได้เป็น 3 เคลด (Clade) ดังแสดงในภาพที่ 4-4 คือ เคลด A, B และ C ทั้งนี้จะพบว่า ชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน จัดไว้อยู่ ในเคลดเดียวกัน คือเคลด A แต่อยู่ในเคลดย่อยต่างกัน คือแยกชาจีน และชาอัสสัม ออกจากชาน้ำมัน โดยที่ชาจีนกับชาอัสสัมมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าระหว่างชาจีนกับชาน้ำมัน หรือ ระหว่างชาอัสสัมกับชาน้ำมัน ทั้งนี้ผลจากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน Phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธีนี้ สอดคล้องกับการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-joining โมเดล Maximum Composite Likelihood เช่นกัน คือ แยกชาจีน และชาอัสสัม ออกจากชาน้ำมันได้อย่างชัดเจน (ภาพภาคผนวก ค-1)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 4-3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* ในส่วนของยีน *ChS* ตัดด้วยเอนไซม์ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 % เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder; * = ชนิดของชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย; GU722488 = ชาน้ำมัน *C. oleifera*, GU722449 = ชาอัสสัม *C. sinensis* var. *assamica* และ D26594= ชาจีน *C. sinensis*

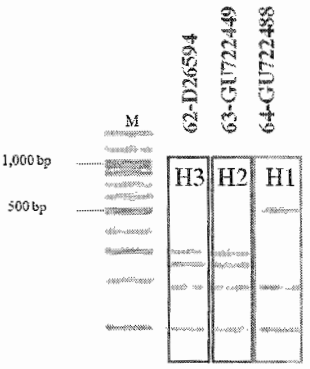
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4-4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Aci*I

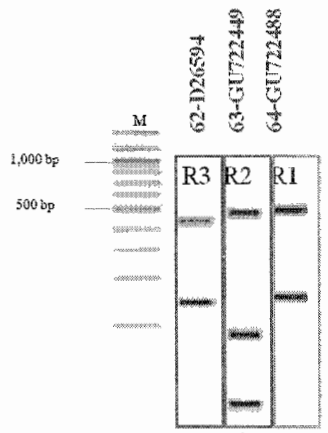


ภาพที่ 4-5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bbv*I

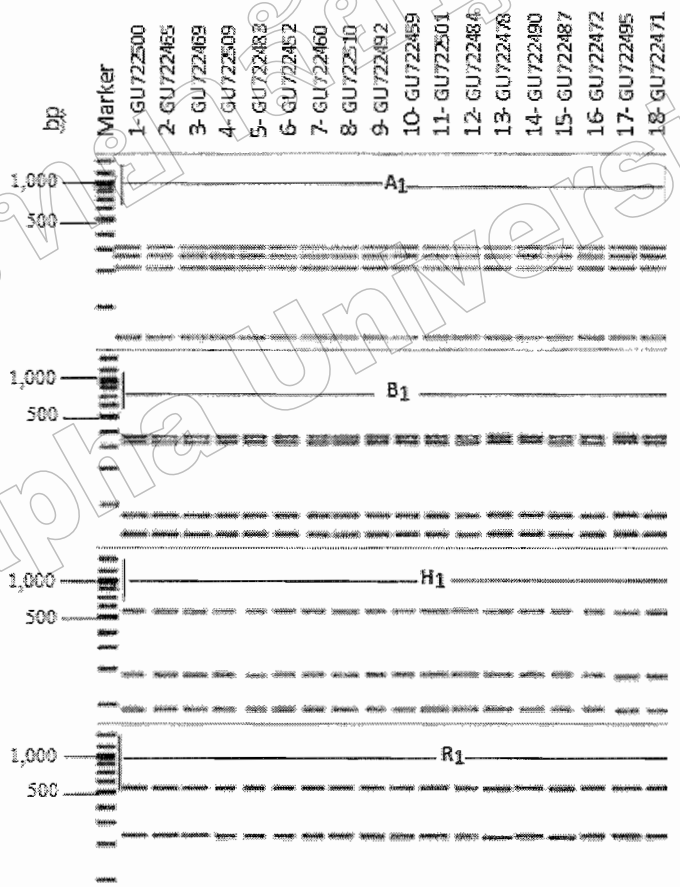


ภาพที่ 4-6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hpa*II

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa*I



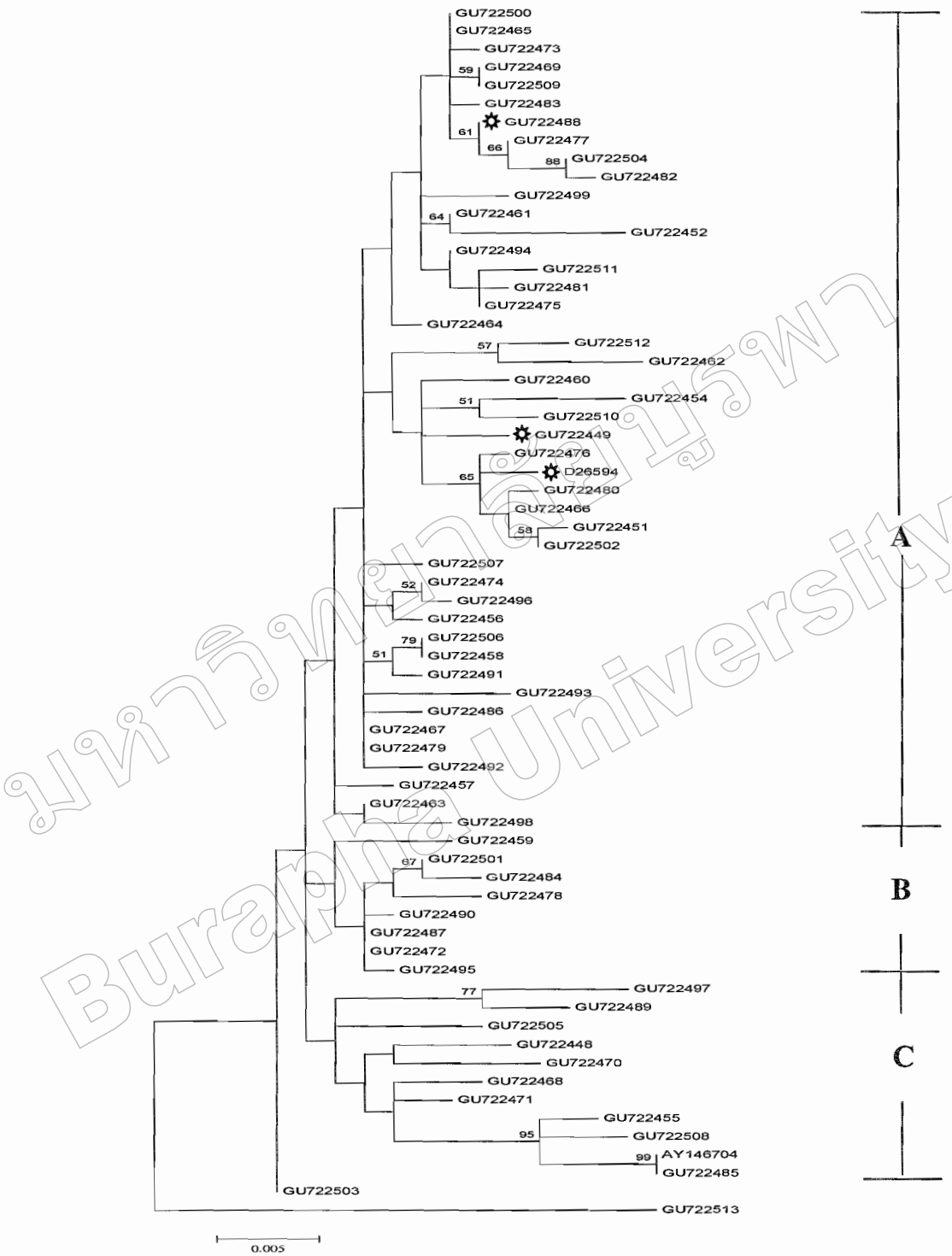
ภาพที่ 4-8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชากลุ่มใหญ่ (1-GU722500, 2-…, 18-GU722471) ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I รวมกัน ปรากฏรูปแบบ $A_1B_1H_1R_1$ ดังภาพ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-2 รูปแบบและขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *ChS* ในชาสกุล *Camellia* แต่ละข้อมูลภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I

enzyme	pattern	restriction size (bp)	sample no.
*Aci*I	A_1	13, 211, 264, 313	1-18, 23-35, 49, 54-61
	A_2	13, 264, 524	19-22, 37, 53, 63-64
	A_3	224, 264, 313	38-41
	A_4	13, 35, 211, 229, 313	42-45, 62
	A_5	211, 277, 313	46, 51
	A_6	13, 65, 146, 264, 313	47-48
	A_7	13, 65, 211, 248, 264	50
	A_8	277, 524	52
*Bbv*I	B_1	22, 76, 333, 370	1-19, 23-36, 39-46, 48-49, 53-62
	B_2	22, 69, 76, 301, 333	20-22, 50, 52, 64
	B_3	22, 28, 69, 76, 301, 305	37
	B_4	22, 28, 76,305, 370	38, 51
	B_5	76, 355, 370	47
	B_6	22, 44, 301, 333	63
*Hpa*II	H_1	84, 177, 540	1-22, 38-41, 51, 57-59, 64
	H_2	84, 177, 245, 295	23-37, 42-43, 45-50, 57, 60-61, 63
	H_3	84, 126, 169, 177, 245	44, 62
	H_4	177, 624	52
	H_5	177, 311, 313	53
	H_6	261, 504	54-55
	H_7	84, 143, 180, 317	56
*Rsa*I	R_1	242, 559	1-22, 24-42, 46-48, 50-56, 58-61, 64
	R_2	69, 173, 559	43-45, 49, 63
	R_3	242, 522	57, 62

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



Substitutions/ site

ภาพที่ 4-9 Phylogenetic tree ในส่วนของยีน *ChS* ของชาสกุล *Camellia* จำนวน 64 ข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) คือ *Pyrenaria menglaensis* (GU722513) สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 5.1 วิธี Maximum Likelihood โมเดล Kimura-2 parameter; ✡= ชนิดของชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย; GU722488 = ชาน้ำมัน *C. oleifera*, GU722449 = ชาอัสสัม *C. sinensis* var. *assamica* และ D26594 = ชาจีน *C. sinensis*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University