

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E47379



**GENETIC ANALYSIS OF JERUSALEM ARTICHOKE
(*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) USING SRAP
AND EST-SSR MARKERS**

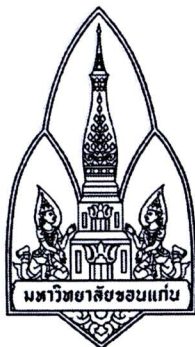
MISS DOLRAT SUDLAH

**A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY**

2011



E47379



**GENETIC ANALYSIS OF JERUSALEM ARTICHOKE
(*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) USING SRAP
AND EST-SSR MARKERS**

MISS DOLRAT SUDLAH



**A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY**

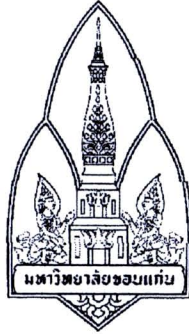
2011

**GENETIC ANALYSIS OF JERUSALEM ARTICHOKE
(*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) USING SRAP
AND EST-SSR MARKERS**

MISS DOLRAT SUDLAH

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2011



THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY


Thesis Title: Genetic Analysis of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)
using SRAP and EST-SSR markers


Author: Miss Dolrat Sudlah

Thesis Examination Committee

Dr. Piyarat Chareonsap	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Sanun Jogloy	Member
Asst. Prof. Dr. Preeya Wangsomnuk	Member
Dr. Monthira Monthatong	Member

Thesis Advisors:


..... Advisor
(Asst. Prof. Dr. Preeya Wangsomnuk)


.....
(Assoc.Prof. Dr.Lampang Manmart)

Dean, Graduate School


.....
(Asst. Prof. Dr. Kiat Sangaroon)

Dean, Faculty of Science

ดลรัชต์ สุดหล้า. 2554. การวิเคราะห์พันธุกรรมแก่นตะวันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SRAP และ

EST-SSR. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ. ดร. ปรียา หวังสมนึก

บทคัดย่อ

E 47380

แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) เป็นพืชทางเลือกสำหรับเกษตรกรสามารถใช้ในการผลิตเพื่อเพิ่มความหลากหลายสำหรับผลิตภัณฑ์ ปัจจุบันได้มีการรวบรวมพันธุ์แก่นตะวันจากต่างประเทศเพื่อนำมาพัฒนาพันธุ์ที่สามารถปรับตัวได้ดีในสภาพเพาะปลูกของประเทศไทย การนำเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์แก่นตะวัน ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาไพรเมอร์ SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) จำนวน 9 คู่ มาใช้เพื่อศึกษาพันธุกรรมแก่นตะวัน 47 จีโนไทป์ พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแก่นตะวันที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 95 ถึง 1000 คู่เบส จำนวน 219 แถบ ในจำนวนนี้มีแถบดีเอ็นเอที่เป็นมีความแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 53.9-100% และมีค่าเฉลี่ย 86.0% โดยค่า Polymorphic information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.90-0.96 และมีค่าเฉลี่ย 0.95 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวันด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มแก่นตะวัน 47 จีโนไทป์ ออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสามารถแยกกลุ่มแก่นตะวันได้ตามแหล่งกำเนิดที่มาจากแคนาดา และ อเมริกาใต้ เพื่อพัฒนาไพรเมอร์ EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค ได้ทำการคัดกรอง Expressed Sequence Tags (ESTs) ที่คล้ายคลึงกับยีนต้านทานโรคจำนวน 69 หมายเลข จาก unigene ของแก่นตะวันจำนวน 21,994 unigene ในฐานข้อมูล Composite Genome Project Database พบว่าสามารถแบ่งกลุ่ม ESTs 69 หมายเลขได้ตามประเภทของยีนต้านทานโรคได้เป็น 4 กลุ่มคือ NBS-LRR, CC-NBS(-LRR), TIR-NBS-LRR และ R genes-mediated resistance signaling protein classed genes จำนวน 20, 25, 20 และ 4 หมายเลขตามลำดับจำแนกรูปแบบและวิเคราะห์การกระจายของไมโครแซทเทลไลท์หรือลำดับเบสซ้ำใน ESTs ของแก่นตะวันจำนวน 69 เลขหมาย พบว่ามี 41 เลขหมายที่พบลำดับเบสซ้ำคิดเป็น 59.4% โดยมีความถี่ลำดับเบสซ้ำ 1 ต่อ 1.19 kb และพบลำดับเบสซ้ำแบบ penta-nucleotide repeat มากที่สุดถึง 65.2% รองลงมาได้แก่ hexa-, tri-, และ tetra-nucleotide repeats คิดเป็น 20.3%, 8.7% และ 5.8% ตามลำดับ ออกแบบไพรเมอร์ EST-SSRs จำนวน 27 คู่ ในจำนวนนี้มีไพรเมอร์ EST-SSRs จำนวน 22 คู่คิดเป็น 81% ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันได้ นำเอาไพรเมอร์ EST-SSRs จำนวน 6 คู่มาทดสอบประสิทธิภาพในการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมในแก่นตะวัน 47 จีโนไทป์ พบว่า

สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแก่นตะวันจำนวน 13 แถบ ในจำนวนนี้มีแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 9 แถบ คิดเป็น 69.23% โดยค่า polymorphic information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0-0.77 และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวันด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มแก่นตะวัน 47 จีโนไทป์ออกเป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจนแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ EST-SSRs สามารถนำมาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของแก่นตะวันได้และมีโอกาสนำมาใช้ในแยกกลุ่มตามความสามารถต้านทานโรคได้

Dolrat Sudlah. 2011. **Genetic Analysis of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using SRAP and EST-SSR markers.** Master of Science

Thesis in Biology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Asst. Prof. Dr. Preeya Wangsomnuk

ABSTRACT

E 47380

Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) is an alternative plant for farmers to increase a variety of products. Since it was introduced into Thailand recently, breeding and promotion of high-quality and new varieties crop is an important task. Using molecular technique is potential to reduce time and budget in the breeding process. Nine SRAP (sequence-related amplified polymorphism) primer combinations were used to employ genetic diversity of 47 *H. tuberosus* genotypes, 219 distinct DNA fragments were generated in the range of 95-2000 bp. Percentage polymorphism ranged from 53.9-100.0%, with an average of 86.0%. The Polymorphic information content (PIC) ranged from 0.90 to 0.96 with an average 0.95 revealed that all primer combinations had a high polymorphic DNA fragment. By the developed dendrograms through UPGMA clustering, 47 *H. tuberosus* were grouped into three clusters (Simple matching coefficient = 0.67). The genotype groupings revealed agreement of the origin of *H. tuberosus* in Canada and USA. These results demonstrated that SRAP technique is an effective tool for estimating genetic diversity based on the origin of *H. tuberosus*. To identify EST-SSR markers related to disease resistance genes (*R*-gene), 69 of 21,994 Jerusalem artichoke transcript assemblies in the Compositae Genome Program Database were collected and annotated. All 69 ESTs were homologous to *R* gene and classified into 4 different *R* gene categories; 20, 25, 20 and 4 ESTs were NBS-LRR, CC-NBS (-LRR), TIR-NBS-LRR and *R* genes-mediated resistance signaling protein classed genes. These 69 ESTs were mined for analyzing SSRs, a total of 41 ESTs contained SSRs which were 59.4% with an average frequency of SSR as ~1/1.19 kb. The pentanucleotide repeat motifs were the most abundant SSRs, accounting for 65.2% followed by 20.3%, 8.7%, and 5.8% for hexa-, tri- and tetra-nucleotide repeats, respectively. A total of 27 EST-SSR primer pairs were developed and used to amplify genomic DNA of *H. tuberosus*. Of these, 22 (81%) primers were successful amplification. The six EST-SSR primers were used to evaluate the potential of EST-SSR markers in genetic diversity analysis of 47 *H. tuberosus* genotypes. These primer sets were given scorable bands with of a total 13 alleles. Of these, 9 alleles were polymorphic bands (69.23%). The PIC values ranged from 0 to 0.77. Based on the developed dendrograms through UPGMA clustering, 47 *H. tuberosus* were grouped into three clusters (simple matching coefficient = 0.75), a total of 47 *H. tuberosus* genotypes were grouped into three major clusters, this grouping will facilitate use of molecular marker for disease resistance in Jerusalem artichoke breeding program.

**Goodness Portion to the Present Thesis is Dedicated
for my Parents and Entire Teaching Staff**

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to take this opportunity to express my sincere thankfulness to everyone contributing to completion of this thesis. Moreover, my appreciation extends to those who were involved in my study and research but whose name are not mentioned here.

Firstly, I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Asst. Prof. Dr. Preeya Wangsomnuk for her kindness in providing an opportunity to be her advisee. I am also appreciated for her valuable supervision, suggestions, encouragement, supporting, guidance and criticism throughout the course of my study.

I am indebted to Assoc. Prof. Dr. Sanun Jogloy, Dr. Piyarat Chareonsap and Dr. Monthira Monthatong for their kind suggestions and support as members of my thesis examination committee.

My deepest appreciation goes to Central laboratory 2, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University for providing laboratory facilities and Kaentawan Research Project, Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University for supporting all of Jerusalem artichoke germplasms in this research.

Additional thanks extend to Mr. Cherdsak Maesup and Mr. Suchart Prateep makintra for a kind support throughout this my study and to all the colleagues of the Central laboratory 2, Department of Biology for their warm friendship, suggestion and all supports. They always make me enjoy my life during study in this program.

Finally, my sincere and deepest grateful are toward to my parent and my family for their tender love and definite care.

Dolrat Sudlah

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	iv
ACKNOWLEDGEMENTS	v
TABLE OF CONTENTS	vi
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Rationale	1
1.2 Objectives	3
1.3 Anticipated output	3
1.4 Scope of the study	3
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	5
2.1 Molecular marker and plant genetics research	5
2.1.1 Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP)	6
2.1.2 Expressed sequence tag (EST)	10
2.1.3 Microsatellites or Simple Sequence Repeats (SSRs)	11
2.1.4 EST-SSR	12
2.2 Diseases on Jerusalem artichoke	13
2.2.1 Sclerotinia wilt/rot	13
2.2.2 Southern wilt/blight/coilar rot	14
2.2.3 Powdery mildew	15
2.2.4 Rust	15
2.2.5 Apical chlorosis	16
2.3 Plant disease resistance gene	16
2.4 Isolation and molecular cloning of plant disease resistance genes	20
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	24
3.1 Plant materials	24

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
3.2 DNA extraction and purification	25
3.3 Genetic diversity of <i>H. tuberosus</i> using SRAP markers	26
3.3.1 DNA amplification by SRAP primers and detection	26
3.4 Genetic diversity of <i>H. tuberosus</i> using EST-SSR markers	27
3.4.1 Searching for Jerusalem artichoke EST databases for resistance gene homologs	27
3.4.2 Sequence and genetic diversity analysis	28
3.4.3 Searching for the microsatellites	28
3.4.4 Designing primer for EST-SSRs	28
3.4.5 PCR amplification by EST-SSR primers and detection	29
3.4.6 DNA cloning, sequencing and analysis	29
3.5 Data analysis	30
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION	33
4.1 Genetic diversity of <i>H. tuberosus</i> genotypes using SRAP markers	33
4.2 Genetic diversity of <i>H. tuberosus</i> based on EST-SSR markers	42
4.2.1 Searching Jerusalem artichoke EST databases for resistance gene homologs	42
4.2.2 Sequence and genetic diversity analysis	43
4.2.3 Searching for microsatellites in ESTs	46
4.2.4 Genetic diversity analysis	48
4.2.5 EST-SSR marker validation	52
4.2.6 Gene isolation and sequence analysis	52
4.2.4 Development of potentially functional EST-SSR markers	57
CHAPTER V CONCLUSION	64
REFERENCES	66
APPENDICES	82
APPENDIX A Searching Jerusalem artichoke EST databases for resistance gene homologs	83

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
APPENDIX B The dendrogram based on the SRAP and EST-SSR data showing the genetic relationships among 47 <i>H.tuberosus</i> genotypes	89
APPENDIX C Chemicals and biochemical reagents	102
VITAE	107

LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1 The application of SRAP markers in plant research.	9
Table 2.2 Conserved amino acids on disease resistance protein (Collins et al, 1998).	20
Table 2.3 First cloned plant disease resistance gene	21
Table 3.1 Plant materials used in this study.	24
Table 3.2 Sequences of the SRAP primers used in this study	26
Table 3.3 Similarity coefficient studies	31
Table 3.4 Two-way frequency table for all pairs of two objects i and j	32
Table 4.1 Parameters of 47 samples of <i>H. tuberosus</i> amplified with 9 primer combination	38
Table 4.2 Genetic similarity of 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes from SRAP technique and the cophenetic correlation coefficients of matrices obtained from cophenetic values	40
Table 4.3 Consensus fork index among the dendrograms (UPGMA) produced by similarity coefficients among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes by SRAP technique	40
Table 4.4 Summary of 69 annotated ESTs and conserved domains	44
Table 4.5 Summary of EST-SSRs indentified	47
Table 4.6 Oligonucleotide primers used to amplify resistance gene analogues	49
Table 4.7 Parameters of 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes amplified with 6 EST-SSR primers.	60
Table 4.8 Genetic similarity of 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes from EST-SSR technique and the cophenetic correlation coefficients of matrices obtained from cophenetic values	61
Table 4.9 Consensus fork index among the dendrograms(UPGMA) produced by similarity coefficients among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes by EST-SSR markers.	62

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 Diagrammatic representation of the SRAP primer sequences	7
Figure 2.2 Domain structures of NBS-LRR proteins (Youssef et al., 2004)	20
Figure 4.1 The extent of SRAP polymorphism observed among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes, revealed by ME2-EM5 primers on 10% polyacrylamide gel; Ladder: 100 bp DNA ladder plus, Vivantis	33
Figure 4.2 The extent of SRAP polymorphism observed among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes, revealed by ME2-EM6 primers on 10% polyacrylamide gel; Ladder: 100 bp DNA ladder plus, Vivantis	34
Figure 4.3 The extent of SRAP polymorphism observed among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes, revealed by ME2-EM8 primers on 10% polyacrylamide gel; Ladder: 100 bp DNA ladder plus, Vivantis	34
Figure 4.4 The extent of SRAP polymorphism observed among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes, revealed by ME5-EM5 primers on 10% polyacrylamide gel; Ladder: 100 bp DNA ladder plus, Vivantis	35
Figure 4.5 The extent of SRAP polymorphism observed among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes, revealed by ME5-EM6 primers on 10% polyacrylamide gel; Ladder: 100 bp DNA ladder plus, Vivantis	35
Figure 4.6 The extent of SRAP polymorphism observed among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes, revealed by ME5-EM8 primers on 10% polyacrylamide gel; Ladder: 100 bp DNA ladder plus, Vivantis	36
Figure 4.7 The extent of SRAP polymorphism observed among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes, revealed by ME7-EM5 primers on 10% polyacrylamide gel; Ladder: 100 bp DNA ladder plus, Vivantis	36
Figure 4.8 The extent of SRAP polymorphism observed among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes, revealed by ME7-EM6 primers on 10% polyacrylamide gel; Ladder: 100 bp DNA ladder plus, Vivantis	37

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 4.9 The extent of SRAP polymorphism observed among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes, revealed by ME7-EM8 primers on 10% polyacrylamide gel; Ladder: 100 bp DNA ladder plus, Vivantis	37
Figure 4.10 The dendrogram based on the SRAP primer data showing the genetic relationships among 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes based on the UPGMA clustering for Simple Matching coefficients	41
Figure 4.11 Neighbor-joining tree produced from an analysis of the similarity matrix of the amino acid sequences translated from 69 <i>H. tuberosus</i> ESTs	45
Figure 4.12 PCR amplification of F ₁ HEL65xJA6 genomic DNA using EST-SSR primers as follows: (1) HEL457326, (2) HEL455346, (3) HEL446443, (4) HEL452935, (5) HEL471160, (6) HEL444841, (7) HEL454403, (8) HEL447036, (9) HEL451666, (10) HEL449110, (11) HEL465866, (12) HEL436736, (13) HEL449466, (14) HEL440001, (15) HEL440872, (16) HEL453765	52
Figure 4.13 Screening the positive colonies of NKK, WNKK PPW and JNKK, revealed by 1% agarose gel, the number indicates clone accession number. (-): Negative control	53
Figure 4.14 Comparison of the nucleotide sequence of <i>NKK</i> and EL449960 available in the CGPDB database. Key: Single letters: nucleotide. "*": identical.	54
Figure 4.15 Comparison of the nucleotide sequence of <i>WNKK</i> and EL 438367 available in the CGPDB database. Key: Single letters: nucleotide. "*": identical.	55
Figure 4.16 Comparison of the nucleotide sequence of <i>PPW</i> and EL 448188 available in the database. Key: Single letters: nucleotide. "*": identical.	56

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
<p>Figure 4.17 PCR products amplified with EST-SSR primers (NKK, WTNP, WNKK, JNKK, YNKK and PPW) on <i>H. tuberosus</i> genotypes; ‘JA6’ (J), ‘AMES2747’ (A), ‘HEL 308’ (H), ‘PI547237’ (P), and <i>Tithonia diversifolia</i> (B), M : 100 bp Ladder plus, (Vivantis).</p>	57
<p>Figure 4.18 PCR amplification of 47 <i>H. tuberosus</i> samples with EST-SSR primers, a) NKK, b) WTNP, c) WNKK, d) JNKK, e) YNKK, f) PPW, Ladder: 100 bp DNA ladder plus, (Vivantis).</p>	59
<p>Figure 4.19 UPGMA dendrogram with Simple matching similarity coefficients from the EST-SSR data of 47 <i>H. tuberosus</i> genotypes.</p>	63