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 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) (Asst. Prof. Dr. Kiat Sangaroon)
Dean, Graduate School Dean, Faculty of Science

ดลรัชต์ สุดหล้า. 2554. **การวิเคราะห์พันธุกรรมแก่นตะวันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SRAP และ EST-SSR.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ. ดร. ปรียา หวังสมนึก

บทคัดย่อ

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 ซึ่งสามารถแยกกลุ่มแก่นได้ตามแหล่งกำเนิดที่มาจากแคนนาดา และ อเมริกาได้ 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 หมายเลขตามลำดับ จำแนกรูปแบบและวิเคราะห์การกระจายของไมโครแซทเทลไลท์หรือลำดับเบสซ้ำใน 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

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 extents 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

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES (Cont.)

LIST OF FIGURES (Cont.)