

การพัฒนาเครื่องหมาย DNA บริเวณ Simple Sequence Repeats (SSRs) เพื่อการจำแนกและทำมาตรฐานพันธุ์กล้วยไทย

จามร สมณะ¹, ทิวา โรจนปริตตา¹, สิริภาพ วงษ์เนียม², ศศิวิมล แสงวงผล³, ปิยวิภา จรรย์ทรัพย์⁴, จิตาพร ภูมิชัย⁴

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

² หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

³ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

⁴ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

บทคัดย่อ

กล้วย (*Musa* L) เป็นพืชเศรษฐกิจและแหล่งอาหารที่สำคัญในเขตร้อนและกึ่งร้อนของโลก การดูแลและปรับปรุงแหล่งพันธุกรรมกล้วยเป็นสิ่งสำคัญในด้านความมั่นคงทางการผลิตอาหารและการใช้ประโยชน์ในรูปแบบอื่นๆ แต่ว่าการจำแนกชนิดและพันธุ์กล้วยไม่แน่นอนและบางส่วนยังเป็นปัญหา โดยเฉพาะในกลุ่มกล้วยปลูกทั้งนี้เพราะมีความหลากหลายของแหล่งกำเนิดที่ซับซ้อนและไม่ทราบแน่ชัด ได้มีการค้นหาและตรวจสอบความหลากหลายของกล้วยบ้างแล้วแต่ก็ยังไม่ได้รับความกระจ่าง และกล้วยในไทยมีส่วนร่วมด้วยน้อยมาก จากปัญหาเหล่านี้จึงจำเป็นต้องมีการใช้เครื่องหมายทาง DNA ที่มีความละเอียดมากขึ้นเพื่อให้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้นเพื่อการจัดการทรัพยากรทางพันธุกรรม Simple Sequence Repeats (SSRs) หรือ microsatellite DNA marker เป็นหนึ่งในเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความสามารถในการจำแนกสูงที่สุดไม่ใช่แค่พันธุ์หรือหรือสายพันธุ์กล้วยแต่ยังบอกสายต้นและความสัมพันธ์กับพ่อแม่พันธุ์ต้นกำเนิดในลูกผสมได้ การพัฒนา microsatellite marker ในกล้วยไทยในการศึกษานี้ใช้ genomic DNA library ของ *Musa balbisiana* กล้วยตานีป่าตาดหลวง (BB genome) ซึ่งเพิ่มความเข้มข้นในส่วนของเบสซ้ำ (CT)_n, (GT)_n, (AAC)_n และ (GAA)_n ด้วยการจับกับเม็ดแม่เหล็กแล้วเลือกประมาณ 100 โคลนที่มีซ้ำ DNA เหล่านี้เพื่อสร้างอย่างน้อย 50 microsatellite loci ในจำนวนนี้ 28 คู่ primer ที่ใช้ได้ดีนำมาทดสอบกับกล้วย 95 ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนกล้วยป่าชนิดต่างๆ และกล้วยปลูกจีโนม AA, AAA, AAB, ABB และ BBB ลายพิมพ์ DNA ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างจะนำมาประเมินค่าความหลากหลายของรูปแบบเฉลี่ย (PIC) ค่าคาดการณ์ความหลากหลายเฉลี่ยของยีนต่อตำแหน่ง (Hi) จำนวนอัลลีลเฉลี่ยและความถี่อัลลีลต่อตำแหน่ง ซึ่งค่าที่ได้และรูปแบบสามารถนำมาใช้เป็นตัวอ้างอิงพันธุ์กล้วยสำหรับการจัดการทรัพยากรพันธุ์กล้วยทั้งในระดับประเทศและระดับโลก

คำสำคัญ: Simple Sequence Repeats (SSRs), รูปแบบความหลากหลายของ DNA, เครื่องหมายโมเลกุล, พันธุ์กล้วยปลูก, *Musa*, multiplex PCR, fluorescence probe, capillary fragment analysis

Project code: MRG5380133

Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) DNA Markers for Identification and Standardization of Thai Bananas

Jamorn Somana¹, Tiwa Rotchanapreeda¹, Sirapope Wongniam², Sasivimon Swangpol³, Piyarat Chareonsap⁴ and Thitaporn Phumichai⁴

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

²Central Instrument Facility, Faculty of Science, Mahidol University

³Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University

⁴Plant Genetic Conservation Project, under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn

Abstract

Banana (*Musa* L.) is an economically and nutritionally important tropical and subtropical food crops in many countries. Maintenance and improvement banana germplasm are important to ensure the safety for food crop production and other uses. However, identification of banana species and cultivars is not very precise and some still problematic. This usually happens especially in cultivars due to the origin and diversity of edible banana genetic backgrounds are not well known and rather complex. Banana biodiversity and genetic relationships have been evaluated with respect to many parameters but still not very decisive. Little contribution of studies has been done on characterization of Thai bananas. From these problems, it is important to employ more powerful DNA markers to clarify and utilize that knowledge to manage our genetic resources. Simple Sequence Repeats (SSRs) or microsatellite DNA markers are among the most powerful markers, not only to clarify banana samples in clone, variety or cultivar group levels but also able to identify parental relationship in hybrids. Development of microsatellite markers for Bananas in Thailand will be done by using genomic library of *Musa balbisiana* 'Tani Pa Tadluang' (BB genome), which will be enrich for (CT)_n, (GT)_n, (AAC)_n and (GAA)_n repeats using magnetic particles then clone and select. About 100 positive clones will be selected and designed for at least 50 of microsatellites loci. Of which, at least effective 28 primer pairs will be tested for about 95 represent *Musa* species and cultivars (AA, AAA, AAB, ABB, and BBB genome). The DNA fingerprint patterns from each sample will be evaluated for the average polymorphism information content (PIC) value, the average expected gene diversity per loci (H_i), the average numbers of allele and allele frequency of each loci in the test population of wild and cultivated bananas. Those values and fingerprinting patterns will be standardized and set as references for Thai bananas for further genetic resource management of the nation and worldwide.

Keywords: Simple Sequence Repeats (SSRs), DNA polymorphisms, molecular markers, *Musa* cultivars, multiplex PCR, fluorescence probe, capillary fragment analysis