Thesis Title Molecular Identification of *Dimocarpus longan* L., *Curcuma* spp., *Pueraria* spp. and *Ficus* spp. By SCAR Markers

Author Miss Supranee Sitthiphrom

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai Chairman

Mr. Boontham Thakumfu Member

Dr. Nattaya Dum-ampai Member

ABSTRACT

Sequence characterized amplified regions (SCAR) markers based on PCR amplification were developed through high annealing temperature RAPD (HAT-RAPD) technique. Regarding for HAT-RAPD primer sequences, SCAR primers were designed for amplification at particular loci in plant genome. The SCAR markers provided highly specificity and fidelity because the SCAR primers amplified single bands corresponding to genetically defined loci. Based on this techniques, it can be used successfully identified in many plant species.

In this work, 4 plants taxa including longan (*Dimocarpus longan* L.), curcuma (*Curcuma* spp.), fig (*Ficus* spp.) and kwao kreur (*Pueraria* spp.) have been investigated by HAT-RAPD. It was found that, these technique could distinguish the genetic differences within of these 4 plant species.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Consequently, the unique HAT-RAPD markers were chosen to develop for SCAR markers. These markers were confirmed specifically by Southern Bolt Hybridization. Subsequently, these markers amplified by OPX01 (with 400 bp) for *P. mirifica*, OPW09 (with 400 bp) for *F. hirta*, OPAH04 (with 300 bp) for Phetsakorn and OPX03 (with 600 bp) for Pathumma. Then these markers were subcloned and sequenced. The SCAR primers were designed based on 9-14 sequences of each HAT-RAPD markers. These pair of primers were $OPX01F1_{396}$ /$OPX01R1_{396}$, $OPW09F1_{398}$/$OPW09R1_{398}$, $OPAH04F1_{299}$/$OPAH04R1_{299}$ and $OPX03F1_{611}$/$OPX03R1_{611}$ for *P. mirifica*, *F. hirta*, Phetsakorn and Pathumma, respectively. A pair of primers $OPX01F1_{396}$/ $OPX01R1_{396}$ were specifically identified to *P. mirifica* and $OPW09F1_{398}$/ $OPW09R1_{398}$ were to *F. hirta*. Whereas, a pair of primers $OPAH04F1_{299}$/ $OPAH04R1_{299}$ were able to identify highly genetic relationship of the longan members (Phetsakorn, Naraphirom, Vietnam and Pingpong) and $OPX03F1_{611}$ /$OPX03R1_{611}$ were to Pathumma members (Pathumma, Pathummadaeng and Pathummadaeng SP).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การระบุระดับโมเลกุลพันธุ์ลำไย ปทุมมา กวาวเครือ และมะเดื่อโดยใช้เครื่องหมาย SCAR

ผู้เขียน นางสาวสุปราณี สิทธิพรหม

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย	ประธานกรรมการ
นายบุญแถม ถาคำฟู	กรรมการ
ดร. นาตยา ดำอำไพ	กรรมการ

บทคัดย่อ

Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) เป็นเครื่องหมายอณูโมเลกุลที่พัฒนามาจากเทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature RAPD) ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส การออกแบบไพรเมอร์ SCAR จะใช้ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากลำดับเบสของเครื่องหมายอณูโมเลกุล HAT-RAPD เครื่องหมายอณูโมเลกุล SCAR เป็นวิธีที่ให้ความเจาะจงและชัดเจน เนื่องจากไพรเมอร์ SCAR จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบเดียวที่มีขนาดตรงกันกับขนาดของโมเลกุลดีเอ็นเอ ที่ได้จากเครื่องหมายอณูโมเลกุล HAT-RAPD ด้วยหลักการดังกล่าวจึงมีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการระบุพันธุ์พืชหลายชนิด

ในการศึกษานี้ได้ใช้เทคนิค HAT-RAPD ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นของพืช 4 ชนิด ได้แก่ ลำไย (*Dimocarpus longan* L.) ปทุมมา (*Curcuma* spp.) มะเดื่อ (*Ficus* spp.) และกวาวเครือ (*Pueraria* spp.) พบว่าสามารถบอกความแตกต่างในระดับพันธุกรรมของพืชในแต่ละชนิดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นได้คัดเลือกเครื่องหมายอณูโมเลกุล HAT-RAPD ที่จำเพาะของพืชแต่ละชนิดมาใช้ในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายอณูโมเลกุล SCAR โดยคัดเลือกเครื่องหมายอณูโมเลกุล HAT-RAPD ของกวาวเครือขาว (*P. mirifica*) ด้วยไพรเมอร์ OPX01 (ขนาด 400 คู่เบส) ของมะเดื่อขน (*F. hirta*) ด้วยไพรเมอร์ OPW09 (ขนาด 400 คู่เบส) จากลำไย (*Dimocarpus longan* L.) พันธุ์เพชรสาคร ด้วยไพรเมอร์ OPAH04 (ขนาด 300 คู่เบส) และของปทุมมา (*Curcuma* spp.) ด้วยไพรเมอร์ OPX03 (ขนาด 600 คู่เบส) ภายหลังจากการพิสูจน์ความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละตัวของพืชแต่ละชนิด โดยวิธี Southern Bolt Hybridization แล้วนำเครื่องหมายอณูโมเลกุลเหล่านี้ไปหาลำดับเบสและออกแบบเป็นไพรเมอร์ SCAR โดยไพรเมอร์แต่ละตัวมีลำดับเบสของไพรเมอร์ HAT-RAPD ตามด้วยลำดับดีเอ็นเอตั้งแต่ 9-14 คู่เบสที่อ่านได้จากเครื่องหมายอณูโมเลกุล HAT-RAPD แต่ละเส้น จึงได้คู่ ไพรเมอร์ SCAR $OPX01F1_{396}$/$OPX01R1_{396}$ สำหรับกวาวเครือขาว คู่ไพรเมอร์ $OPW09F1_{398}$/$OPW09R1_{398}$ สำหรับมะเดื่อขน คู่ไพรเมอร์ $OPAH04F1_{299}$/$OPAH04R1_{299}$ สำหรับลำไยพันธุ์เพชรสาคร และคู่ไพรเมอร์ $OPX03F1_{611}$/$OPX03R1_{611}$ สำหรับพันธุ์ปทุมมา ภายหลังจากการทดสอบไพรเมอร์ SCAR ทุกคู่ พบว่าคู่ไพรเมอร์ $OPX01F1_{396}$/$OPX01R1_{396}$ สามารถระบุกวาวเครือขาว และคู่ไพรเมอร์ $OPW09F1_{398}$/$OPW09R1_{398}$ สามารถระบุมะเดื่อขน ในขณะที่คู่ไพรเมอร์ $OPAH04F1_{299}$/$OPAH04R1_{299}$ สามารถระบุกลุ่มลำไยที่มีความสัมพันธ์กันในระดับพันธุกรรม ได้แก่ เพชรสาคร นราภิรมย์ เวียดนามและปิงปอง และคู่ไพรเมอร์ $OPX03F1_{611}$/$OPX03R1_{611}$ สามารถระบุกลุ่มปทุมมา ได้แก่ ปทุมมา ปทุมมาแดง และปทุมมาแดง SP

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved