แก่นเกษตร ๓๔ (๒) : ๑๒๔-๑๓๘ (๒๕๔๙) KHON KAEN AGRIC. 34 (2) : 124-138 (2006)

การวิเคราะห์จีโนมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) โดยใช้ ISSR markers

Assessment of genome and genetic diversity in (*Helianthus tuberosus* L.) with ISSR markers

ปรียา พวงสำลี-หวังสมนึก[1] สุดารัตน์ คำผา[1] สนั่น จอกลอย[2] พินิจ หวังสมนึก[1]
และ ยศินทร์ กิติจันทโรภาส[1]
Preeya Puangsomlee Wangsomnuk[1], Sudarat Khampa[1], Sanun Jogloy[2], Pinich Wangsomnuk[1] and Yasin Kitijataropas[1]

Abstract

Jerusalem artichoke *(Helianthus tuberosus* L.) is native of North America. The high-fructose syrups derived from the tubers may be used primarily as sweeteners in the food industry, also for the production of ethanol and be suitable for use as cattle fodder. There was no genome and genetic diversity information of this plant species. Thus, the aim of this study was to analyze the genetic diversity of *H. tuberosus* germplasm collected from the USA, Germany, France, Russian Federation and Canada using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) technique with primers containing microsatellites which are ubiquitous in plant genomes. A total of 24 primers, containing different Simple Sequence Repeat (SSR) motifs, were tested for potential amplification. Six primers produced 552 repeatable bands in the range of 200-1500 bp, of which 344 were polymorphic PCR products and 47 variety-specific bands whereby flanking sequence 3' anchored primer gave more ISSR-PCR products than that of 5' anchored primers. The ISSR profiles of *H. tuberosus* generated by (GATA)2 (GACA)2, HVH (TCC)5 and (GA)6 YT primers showed that these repeats are abundant in the *H. tuberosus* genome. This genome which distinguished high tuber yield accessions from the others and also separated cultivated accessions from wild *H. tuberosus.*

Keywords: Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), ISSR, PCR, genetic diversity, gemome

---

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
[1] Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[2] ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
[2] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

บทคัดย่อ

แก่นตะวัน (Jerusalem artichoke : *Helianthus tuberosus* L.) เป็นพืชวงศ์เดียวกับทานตะวัน มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกาเหนือ มีความสำคัญในอุตสาหกรรมน้ำตาล เอทานอล อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ เนื่องจากยังไม่พบว่ามีการศึกษาจีโนมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจีโนมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจากแหล่งพันธุกรรมที่ได้จากประเทศสหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐเยอรมัน ฝรั่งเศส รัสเซีย และแคนาดา ด้วยเทคนิค ISSR-PCR ซึ่งอาศัยลำดับเบสแบบซ้ำที่กระจายทั่วไปในจีโนมพืช โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบซ้ำทั้งหมด 24 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 6 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์ผลผลิตแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 552 แถบ มีขนาดประมาณ 200 ถึง 1500 คู่เบส พบแถบที่เป็น polymorphic จำนวน 344 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ (variety-specific band) จำนวน 47 แถบ นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ที่เป็น 3′ anchored สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้มากกว่าไพรเมอร์ที่เป็น 5′ anchored แบบแผนของแถบดีอีนเอที่สังเคราะห์ได้แสดงลำดับเบสซ้ำเป็น $(GATA)_2$ $(GACA)_2$, HVH $(TCC)_5$ และ $(GA)_6$ YT ซึ่งพบมากในจีโนมของแก่นตะวัน จากการวิเคราะห์พันธุ์กรรมของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ สามารถจัดกลุ่มแก่นตะวันที่ให้ผลผลิตหัวสูงออกจากสายพันธุ์อื่น และสามารถแยกแก่นตะวันที่เป็นพันธุ์ป่าออกจากแก่นตะวันที่เป็นพันธุ์ปลูกได้

คำสำคัญ : แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.), ISSR, PCR, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, จีโนม

บทนำ

แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) เป็นพืชล้มลุก อยู่ในวงศ์ทานตะวัน (Asteraceae) ดอกสีเหลืองคล้ายกับทานตะวันแต่มีขนาดเล็กกว่า มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศสหรัฐอเมริกา เนื่องจากมีความสำคัญในอุตสาหกรรมน้ำตาล อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งใช้ส่วนของลำต้นใต้ดินที่สะสมอาหารไว้ เป็นวัตถุดิบในการผลิต นอกจากนี้ในลำต้นของแก่นตะวันยังมีสารอินูลิน (inulin) ซึ่งลดความเสี่ยงการเป็นโรคเบาหวาน และมะเร็งลำไส้ใหญ่ของผู้บริโภค ที่ผ่านมาได้มีการวิจัยเพื่อคัดแยกยีน lectin (Van Damme *et al.*, 1999) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟรุคแตน (fructan) (var der Meer et al., 1998) และได้มีการศึกษาบทบาทของเอนไซม์ Polyphenol oxidase ในแก่นตะวัน (Ziyan and Pekyardimci, 2001)

ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่นำเครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดมาใช้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เช่น RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Hu and Quiros, 1991; Munthali *et al.*, 1992) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995) RFLP (Retriction Fragment Length Polymorphism) (Gentzbittel *et al.*, 1992) SSR (Simple Sequence Repeat) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) และ ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Salimath *et al.*, 1995; Wolfe and Randle, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จาก ISSR marker นั้น พบว่ามีความแปรผันในระดับชนิด

และมีข้อดีมากกว่าเทคนิค RAPD จากการใช้ไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยลำดับเบสแบบซ้ำ หรือที่เรียกว่าไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) ที่พบได้บ่อยในจีโนม อีกทั้งมีจำนวนเบสในไพรเมอร์มากกว่าที่ใช้ในเทคนิค RAPD (Tsumura *et al.*, 1996; Wolfe and Liston, 1998; Camacho and Liston, 2001) จึงช่วยเพิ่มความจำเพาะในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (Fang and Roose, 1997; Nan *et al.*, 2003; Bornet and Branchard, 2001) ทำให้ได้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในตัวอย่างที่ใช้ศึกษา เป็นผลศึกษาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในประเทศไทยนั้นแก่นตะวันยังไม่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลายนัก เนื่องจากได้มีการนำแก่นตะวันจากต่างประเทศเข้ามาเพื่อทดสอบในแปลงปลูกเมื่อไม่นานมานี้ และยังไม่มีการผลิตแก่นตะวันเพื่อการค้าภายในประเทศ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการรวบรวมพันธุ์แก่นตะวันเพื่อให้มีฐานพันธุกรรมที่หลากหลายเพื่อใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์แก่นตะวันให้สามารถปลูกในประเทศไทย ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการนำ ISSR marker มาใช้เพื่อวิเคราะห์จีโนมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน โดยอาศัยข้อได้เปรียบของ ISSR marker ที่ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสในจีโนมของแก่นตะวัน แต่ใช้ประโยชน์จากลำดับเบสแบบซ้ำที่มักพบทั่วไปในจีโนมของยูคาริโอต (Blair *et al.*, 1999) เพื่อทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน รวมถึงการบ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์แก่นตะวันให้ได้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของตลาดต่อไป

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างพืช

แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) โดยได้รับความอนุเคราะห์จากแหล่งรวบรวมพันธุกรรมใน ประเทศสหรัฐอเมริกา (North Central Regional Plant Introduction Station Iowa State University) สาธารณรัฐเยอรมัน ฝรั่งเศส รัสเซีย และแคนาดา (Plant Gene Resource) โดยนำมาปลูกที่แปลงทดสอบของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การสกัดดีเอ็นเอของแก่นตะวัน *(Helianthus tuberosus* L.)

การสกัดดีเอ็นเอของแก่นตะวัน *(Helianthus tuberosus* L.) ทั้ง 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ได้ใช้วิธีดัดแปลงจาก Tai and Tanksley (1990) โดยใช้ใบอ่อนน้ำหนัก 0.3 กรัม ทำให้เซลล์แตกโดยการบดใน extraction buffer (ทริส–ไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 100 mM EDTA ความเข้มข้น 50 mM โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 500 mM SDS ความเข้มข้น 1.25% (w/v) และโซเดียมไบซัลไฟต์ ความเข้มข้น 0.38% (w/v)) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เพื่อแยกเศษเซลล์ออกไป จากนั้นตกตะกอนกรดนิวคลิอิกด้วยโพแทสเซียมอะซิเตต แล้วละลายกรดนิวคลิอิกด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วจึงกำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A) ความเข้มข้น 0.01 ยูนิต/ไมโครลิตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ก่อนที่จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในปฏิกิริยา ISSR–PCR หรือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

Table 1 ***H. tuberosus*** **accessions and their the origins used in this study**

No.	Accession	Germplasm collection	Origin
1	HEL 68	Germany	Germany
2	KKU Ac 001	-	-
3	AMES 2729	North Central Regional Plant Introduction Station Iowa State University, USA.	America
4	HEL 335	Germany	Germany
5	JA 102	Plant Gene Resource, Canada	Germany
6	HEL 65	Germany	Germany
7	JA 89	Plant Gene Resource, Canada	France
8	HEL 66	Germany	Germany
9	HEL 324	Germany	Germany
10	JA 67	Plant Gene Resource, Canada	America
11	JA 81	Plant Gene Resource, Canada	France
12	JA 38	Plant Gene Resource, Canada	Canada
13	CN 52867	Plant Gene Resource, Canada	Russia

การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค ISSR-PCR

การตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบซ้ำที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นหนึ่งใน 13 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสและจำนวนซ้ำของลำดับเบสที่แตกต่างกัน จำนวน 24 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2) ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR-PCR นั้นจะทำการเตรียมสารละลายเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x PCR buffer 0.2 mM dNTP (Fermentas) 2.5 mM $MgCl_2$ (Fermentas) Tag DNA polymerase (Fermentas) ความเข้มข้น 0.04 ยูนิต/ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 1 pmole DNA ต้นแบบ 40 ngDNA ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.20 มิลลิลิตร โดยสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (Corbett Research, Germany) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 ° C เป็นเวลานาน 2 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 ° C เป็นเวลานาน 30 วินาที อุณหภูมิ 45 ° C เป็นเวลานาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 ° C เป็นเวลานาน 1 นาที 30 วินาที โดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 45 รอบ ขั้นสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 72 ° C เป็นเวลานาน 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสในวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer ความเข้มข้น 0.5 เท่า แล้วย้อมด้วยเอธิเดียม

โบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus) (Fermentas) วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม PhotoCaptMw (Vilber Lourmat, France)

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันโดยใช้ ISSR marker

หลังจากที่ได้ตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบซ้ำที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้แล้ว จึงนำไพรเมอร์เหล่านั้นมาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอกับแก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) โดยใช้เทคนิค ISSR-PCR ในการเตรียมสารละลายเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การตั้งโปรแกรมเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง PCR และการตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอ จะทำเช่นเดียวกับในขั้นตอนการตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบของแก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ นั้นจะทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อการตรวจสอบความคงที่ของความสามารถในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิด จากนั้นจึงนำแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม PhotoCaptMw (Vilber Lourmat, France)

การวิเคราะห์พันธุกรรมของแก่นตะวันด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของแก่นตะวันแต่ละสายพันธุ์ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยา ISSR-PCR โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 0 แล้วคำนวณหาค่า similarity index (S.I.) จากสูตร $S.I. = 2n_{ab}/(n_a+n_b)$ เมื่อ n_a และ n_b แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง a และ b ตามลำดับ และ n_{ab} คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้ง 2 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) ก่อนนำมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม SPSS for Window 10.0 และโปรแกรม WinBoot (Yep and Nelson, 1996)

ผลการศึกษา

ไพรเมอร์ ISSR ที่คัดเลือกได้จากสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001

ในการตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบซ้ำที่แตกต่างกันจำนวน 24 ชนิด (ตารางที่ 2) ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นหนึ่งใน 13 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เทคนิค ISSR-PCR เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์ชนิดใดที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ พบว่าไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ โดยไพรเมอร์ที่เป็น dinucleotide motifs ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีเบสสองตัวซ้ำกันหลายครั้งแบบ 3′ anchored จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ KEAN 5 ($(CA)_8$ G), KEAN 6 ($(GA)_6$YT), KEAN 7 ($(GA)_8$ YC) และ KEAN 15 ($(GA)_9$ T) สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ 9 แถบ, 4 แถบ, 4 แถบ และ 6 แถบ ตามลำดับ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300 ถึง 1300 คู่เบส, 300 ถึง 800 คู่เบส,

600 ถึง 1100 คู่เบส และ 500 ถึง 1000 คู่เบส ตามลำดับ ไพรเมอร์ KEAN 3 ซึ่งเป็น trinucleotide motifs แบบ 5′ anchored (HVH $(TCC)_5$) สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ 8 แถบ มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300 ถึง 1000 คู่เบส และไพรเมอร์ KEAN 11 ซึ่งเป็น tetranucleotide motifs ($(GATA)_2(GACA)_2$) สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ 11 แถบ มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300 ถึง 1500 คู่เบส

ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 มีจำนวน 18 ชนิด (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาไพรเมอร์ที่เป็น dinucleotide motifs พบว่าไพรเมอร์ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น GT, TG และ CT ไม่สามารถสังเคราะห์ ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ ในขณะที่ไพรเมอร์ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น GA และ CA สามารถสังเคราะห์ ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ที่เป็น trinucleotide motifs ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น CAC, CGG, CTC, ACC และ ATT ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ แต่ไพรเมอร์ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น TCC สามารถสังเคราะห์ ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ และสำหรับไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบซ้ำเป็น tetranucleotide motifs พบว่าไพรเมอร์ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น TAGG ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้ ในขณะที่ไพรเมอร์ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น GATA และ GACA สามารถสังเคราะห์ ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้

ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสในจีโนมแก่นตะวันกับลำดับเบสของไพรเมอร์

หลังจากที่ได้ตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบซ้ำที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ KKU Ac 001 ได้แล้ว จึงนำไพรเมอร์ KEAN 3, KEAN 5, KEAN 6, KEAN 7, KEAN 11 และ KEAN 15 (ตารางที่ 3) มาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอกับแก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิด สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ ได้จำนวน 552 แถบ ซึ่งมีแถบที่เป็น polymorphic จำนวน 344 แถบ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่างประมาณ 200 ถึง 1500 คู่เบส (ตารางที่ 3)

ทั้งนี้อาจจำแนกไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันออกได้เป็นสามกลุ่ม ได้แก่ ไพรเมอร์ที่มีซ้ำเป็น di–, tri–, และ tetranucleotide motifs พบว่าไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ ไพรเมอร์ KEAN 11 ($(GATA)_2(GACA)_2$) ที่มีซ้ำเป็น tetranucleotide motifs สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมากที่สุดจำนวน 120 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic ได้มากที่สุดจำนวน 94 แถบ โดยมีขนาดประมาณ 300 ถึง 1500 คู่เบส ในขณะที่ไพรเมอร์ KEAN 3 (HVH $(TCC)_5$) สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอจำนวน 98 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic จำนวน 46 แถบ ไพรเมอร์ KEAN 5 ($(CA)_8$ G) สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมดจำนวน 107 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic จำนวน 68 แถบ แถบของดีเอ็นเอมีขนาดระหว่าง 300 ถึง 1400 คู่เบส ไพรเมอร์ KEAN 6 ($(GA)_6$YT) สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 77 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic จำนวน 25 แถบ มีขนาดระหว่าง

Table 2 Primer sequences with total of amplified ISSR markers obtained for KKU Ac 001 accession.

No.	Primer	nucleotide (5' → 3')	primer size (bp)	annealing temperature (^{0}C)	number of bands	Size of bands (bp)
1	KEAN 1	BDB$(TCC)_5$	18	45	0	–
2	KEAN 2	DBDA$(CA)_7$	18	45	0	–
3	KEAN 3	HVH $(TCC)_5$	18	45	8	300 – 1000
4	KEAN 4	$(CAC)_6$	18	45	0	–
5	KEAN 5	$(CA)_8$ G	17	45	9	300 – 1300
6	KEAN 6	$(GA)_6$ YT	18	45	4	300 – 800
7	KEAN 7	$(GA)_8$ YC	18	45	4	600 – 1100
8	KEAN 8	$(CT)_8$ RG	18	45	0	–
9	KEAN 9	$(CA)_8$ RC	18	45	0	–
10	KEAN 10	$(CGG)_6$	18	45	0	–
11	KEAN 11	$(GATA)_2$ $(GACA)_2$	16	45	11	300 – 1500
12	KEAN 12	$(CTC)_{10}$	30	45	0	–
13	KEAN 13	$(CAC)_4$	12	45	0	–
14	KEAN 14	$(GT)_6$	12	45	0	–
15	KEAN 15	$(GA)_9$ T	19	45	6	500 – 1000
16	KEAN 16	$(GA)_9$ AC	20	45	0	–
17	KEAN 17	$(CA)_8$ RT	18	45	0	–
18	KEAN 18	$(TG)_8$ RT	18	45	0	–
19	KEAN 19	$(ACC)_6$	18	45	0	–
20	KEAN 20	CRTAY$(GT)_9$	23	45	0	–
21	KEAN 21	RATYT$(ATT)_4$	17	45	0	–
22	KEAN 22	RAYRATAY$(GA)_7$	22	45	0	–
23	KEAN 23	$(GA)_3$ A	19	45	0	–
24	KEAN 24	GATCG$(TAGG)_6$ TAG	32	45	0	–

B = G, C or T, D = A, G or T, H = A, C or T, R = G or A, V = A. C or G, Y = C or T

200 ถึง 1100 คู่เบส ไพรเมอร์ KEAN 7 ((GA)$_8$ YC) สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 64 แถบ แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic จำนวน 51 แถบ มีขนาดระหว่าง 400 ถึง 1200 คู่เบส และ KEAN 15 ((GA)$_9$ T) สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จำนวน 86 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic จำนวน 60 แถบ มีขนาดระหว่าง 500 ถึง 1000 คู่เบส ในกลุ่มของไพรเมอร์ที่เป็น dinucleotide motifs พบว่าไพรเมอร์ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น CA จะสามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอ (107 แถบ) มากกว่าแถบดีเอ็นเอในไพรเมอร์ที่มีซ้ำของลำดับเบส GA (64 ถึง 86 แถบ) และยังพบอีกว่าไพรเมอร์ที่เป็น tetranucleotide motifs สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอมากที่สุดจำนวน 120 แถบ รองลงมาคือไพรเมอร์ที่เป็น dinucleotide motifs สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอจำนวน 64 ถึง 107 แถบ และไพรเมอร์ที่เป็น trinucleotide motifs สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอจำนวน 98 แถบ

เมื่อแยกไพรเมอร์ออกเป็น 5′ anchored, 3′ anchored และ nonanchored พบว่าไพรเมอร์ที่เป็น nonanchored สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอได้จำนวนมากที่สุด (120 แถบ) ส่วนไพรเมอร์ที่เป็น 3′ anchored สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอจำนวน 64 ถึง 107 แถบ ในขณะที่ไพรเมอร์ที่เป็น 5′ anchored สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดจำนวน 98 แถบ

การวิเคราะห์สายพันธุ์ของแก่นตะวันจากแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าลำดับเบสในจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกันจะมีผลต่อฟีโนไทป์ (phenotype) ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จากการศึกษาพบว่าลำดับเบสของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) มีความแตกต่างกัน จากความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR-PCR พบว่าไพรเมอร์ KEAN 6 ((GA)$_6$ YT) สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ (variety-specific band) ของแก่นตะวัน มากที่สุดถึง 3 สายพันธุ์ (ภาพที่ 1 B) ได้แก่ สายพันธุ์ AMES 2729, HEL 324 และ JA 81 โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 610, 290 และ 265 คู่เบส ตามลำดับ และมีไพรเมอร์อีก 4 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์แก่นตะวันสายพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ ไพรเมอร์ KEAN-

Table 3 Polymorphism exhibited by ISSR primers in thirteen accessions of *H. tuberosus*

No.	Primer	nucleotide (5' → 3')	Primer size (bp)	annealing temperature (°C)	Number of bands	monomorphic bands	polymorphic bands	Percent of polymorphism	Size of bands (bp)
1	KEAN 3	HVH(TCC)$_5$	18	45	98	52	46	46.94	300 – 1100
2	KEAN 5	(CA)$_8$G	17	45	107	39	68	63.55	300 – 1400
3	KEAN 6	(GA)$_6$YT	18	45	77	52	25	32.47	200 – 1100
4	KEAN 7	(GA)$_8$YC	18	45	64	13	51	76.69	400 – 1200
5	KEAN 11	(GATA)$_2$(GACA)$_2$	16	45	120	26	94	78.33	300 – 1500
6	KEAN 15	(GA)$_9$T	19	45	86	26	60	69.77	500 – 1000

7 ((GA)8 YC), KEAN 11 ((GATA)$_2$ (GACA)$_2$), KEAN 15 ((GA)$_9$ T) และ KEAN 3 (HVH (TCC)$_5$) สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 847, 536, 965 และ 400 คู่เบส ซึ่งจำเพาะต่อแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 81, CN 52867, HEL 65 และ AMES 2729 ตามลำดับ (ภาพที่ 1) แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์แก่นตะวันจากไพรเมอร์ KEAN 5 ทั้งนี้จากการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของแก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิด ด้วยเทคนิค ISSR–PCR พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อแก่นตะวันสายพันธุ์ AMES 2729 และ JA 81 จำนวนมากที่สุดสายพันธุ์ละ 2 แถบ ซึ่งได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ KEAN 6, KEAN 7 และ KEAN 3

เมื่อจำแนกไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของแก่นตะวัน โดยแบ่งจากรูปแบบการซ้ำของลำดับเบสออกเป็นสามกลุ่ม ได้แก่ ไพรเมอร์ที่เป็น di–, tri–, tetranucleotide motifs พบว่าไพรเมอร์ที่เป็น dinucleotide motifs สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์แก่นตะวันมากที่สุด (4 สายพันธุ์ ได้แก่ AMES 2729, HEL 324, JA 81 และ HEL 65) โดยไพรเมอร์ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น GA สามารถให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อสายพันธุ์แก่นตะวันมากที่สุด ในขณะที่ไพรเมอร์ที่มีซ้ำเป็นสามเบสและสี่เบส สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์แก่นตะวันไพรเมอร์ละ 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ AMES 2729 และ CN 52867 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาที่ anchored ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ISSR–PCR พบว่าไพรเมอร์ที่เป็น 3′ anchored สามารถให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์แก่นตะวันมากที่สุด

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน

ในการพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ ได้นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา ISSR–PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด มาวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA เพื่อหาค่า S.I. (similarity index) (ตารางที่ 4) และสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม SPSS for Window 10.0 และโปรแกรม Winboot (Yep and Nelson, 1996) (ภาพที่ 2) จากตาราง ค่า S.I. ของแก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ HEL 335 กับ สายพันธุ์ JA 102 มีค่า S.I. สูงที่สุด (0.929) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ JA 67 กับ สายพันธุ์ AMES 2729 มีค่า S.I. ต่ำที่สุด (0.431) จากแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ (ภาพที่ 2) สามารถจำแนกสายพันธุ์ของแก่นตะวันพันธุ์ปลูกออกจากสายพันธุ์ AMES 2729 ที่เป็นพันธุ์ป่า นอกจากนี้ภายในกลุ่มที่เป็นพันธุ์ปลูก ยังสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มที่มีผลผลิตสูง (สายพันธุ์ JA 89, HEL 335, KKU Ac 001, JA 102 และ HEL 66) ออกจากสายพันธุ์ที่มีผลผลิตต่ำที่สุด (สายพันธุ์ JA 81) (สนั่น จอกลอย และคณะ, ติดต่อส่วนตัว)

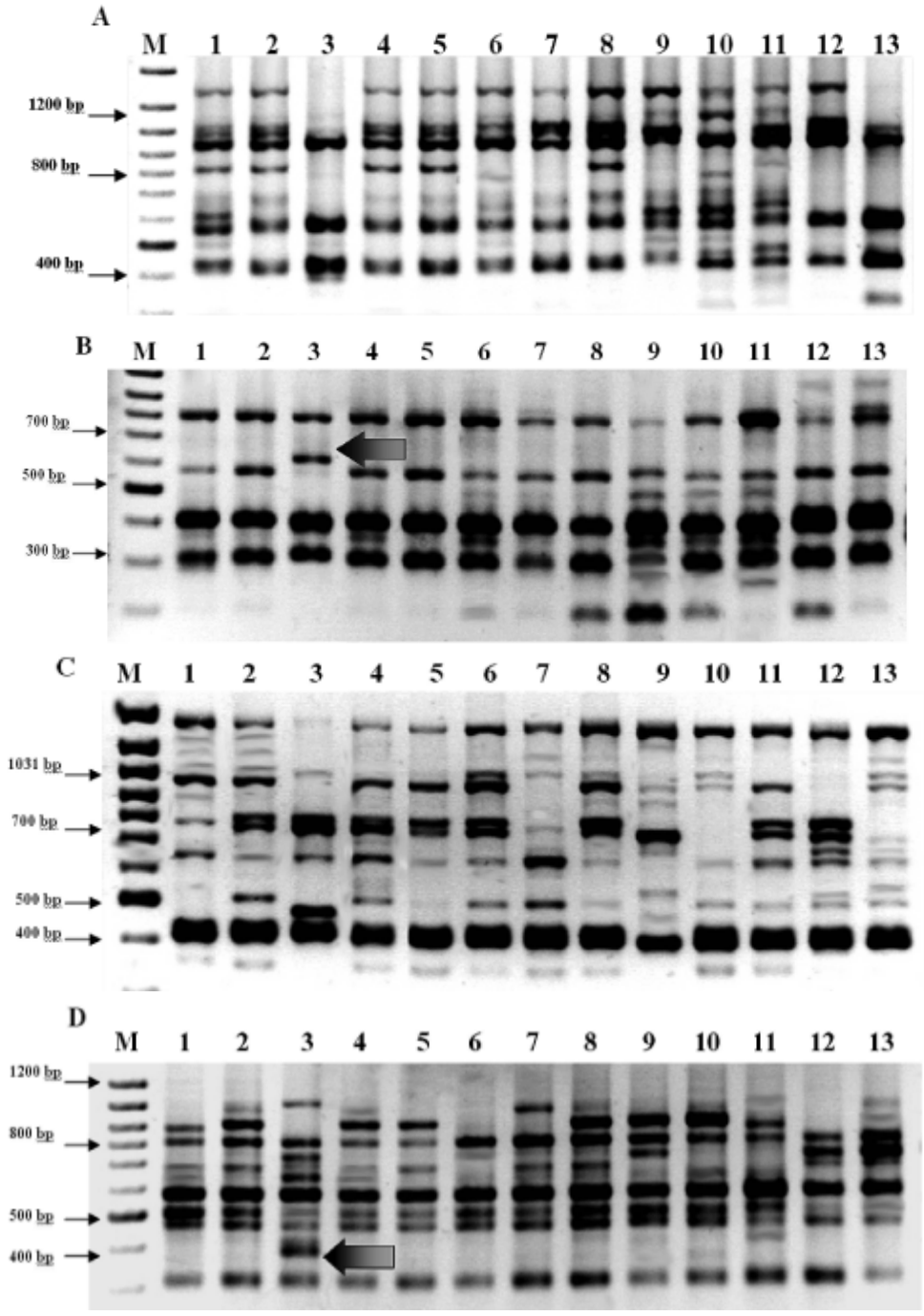

Fig. 1 Electrophoretic pattern obtained with ISSR markers. (A) Primer KEAN 5 (B) primer KEAN 6 (C) primer KEAN 11 and (D) primer KEAN 3 in thirteen accessions. Lane 1-13 are accessions of H. tuberosus as list in table 1. M is100 bp DNA ladder plus (Fermentus). Allows in B and D present variety-specific bands.

Table 4 Similarity index of H. tuberosus accession using ISSR markers

Accession	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. HEL 68	-												
2. KKU 001	0.787	-											
3. AMES 2729	0.472	0.472	-										
4. HEL 335	0.694	0.886	0.481	-									
5. JA 102	0.745	0.907	0.520	0.929	-								
6. HEL 65	0.623	0.623	0.455	0.604	0.615	-							
7. JA 89	0.667	0.818	0.510	0.756	0.773	0.577	-						
8. HEL 66	0.760	0.913	0.491	0.851	0.870	0.667	0.787	-					
9. HEL 324	0.542	0.492	0.441	0.500	0.483	0.525	0.475	0.532	-				
10. JA 67	0.618	0.618	0.431	0.600	0.582	0.625	0.574	0.603	0.655	-			
11. JA 81	0.589	0.589	0.456	0.660	0.642	0.569	0.545	0.576	0.500	0.567	-		
12. JA 38	0.549	0.612	0.490	0.625	0.638	0.528	0.563	0.596	0.564	0.527	0.527	-	
13. CN 52867	0.604	0.667	0.463	0.585	0.627	0.554	0.620	0.679	0.533	0.525	0.475	0.702	-

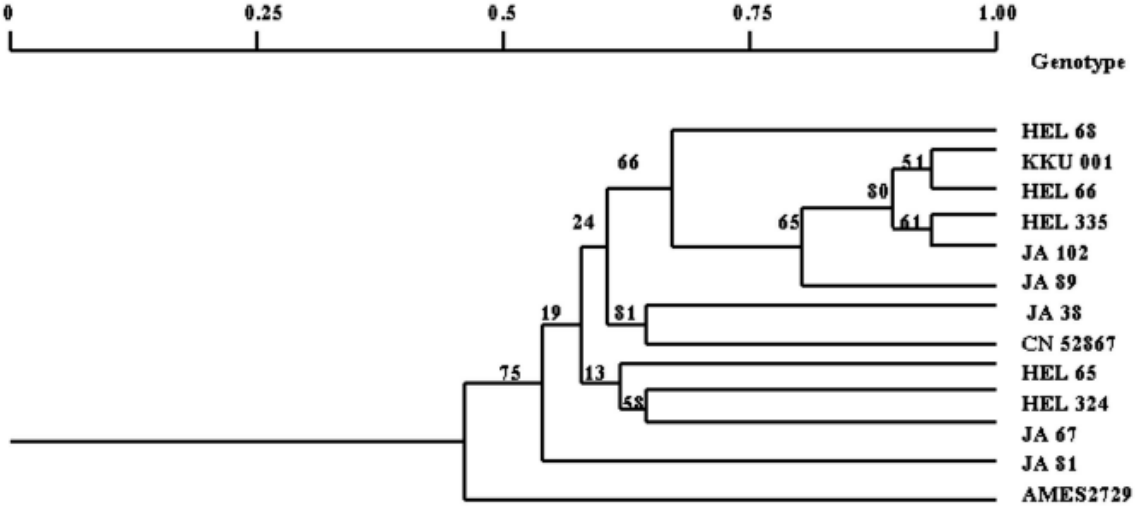

Fig. 2 **Unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) by WinBoot showed the relationships among thirteen accessions. Numbers at branches are bootstrap values (%) generated after 1000 replications.**

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาจีโนมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวันโดยใช้ เทคนิค ISSR-PCR พบว่าเทคนิค ISSR-PCR สามารถบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมของแก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้เช่นเดียวกับที่พบในพืชอื่นๆ เช่น ในข้าวโพด (Wang et al., 1994 and Chin et al., 1996) *Arabidopsis thaliana* (Depeiges *et al.*, 1995) *Quercus macrocarpa* (Dow *et al.*, 1995) ข้าว (Akagi *et al.*, 1997 and Blair *et al.*, 1999) Coffee (Ruas *et al.*, 2003) และข้าวสาลี (Nagaoka and Ogihara, 1997) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสและซ้ำของลำดับเบสที่แตกต่างกัน 24 ชนิด (ตารางที่ 2) จากการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์ KEAN 11 ($(GATA)_2$ $(GACA)_2$) ที่เป็น tetranucleotide motifs สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตได้มากที่สุด (120 แถบ) ซึ่งให้ผลที่คล้ายกับการศึกษาในข้าวโพด (Gupta *et al.*, 1994 and Kantety *et al.*, 1995) โดยพบว่าไพรเมอร์ที่เป็น trinucleotide motifs และ tetranucleotide motifs มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพด ในขณะที่ไพรเมอร์ที่เป็น dinucleotide motifs มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวสาลีมากที่สุด (Nagaoka and Ogihara, 1997) เมื่อพิจารณาที่ซ้ำของลำดับเบสของไพรเมอร์ KEAN 11 ($(GATA)_2$ $(GACA)_2$) ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น GATA และ GACA ซึ่งให้ผลที่แตกต่างไปจากการศึกษาในข้าว (Blair *et al.*, 1999) ที่พบว่าไพรเมอร์ที่เป็น tetranucleotide motifs และมีซ้ำของลำดับเบสเป็น GATA, AGTG และ TCTC สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้มากที่สุด แต่ไพรเมอร์ที่มีซ้ำของลำดับเบสเป็น GATA และ GACA ไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากจีโนมของข้าวได้ และยังพบอีกว่าในจีโนมข้าวมีลำดับเบสที่มีซ้ำแบบ GA และ GT จำนวนมากโดยมีอัตราส่วนเป็น 3 : 1 (Wu and Tanksley, 1993) แต่ในจีโนมของแก่นตะวันกลับพบว่ามีลำดับเบสที่มีซ้ำแบบ CA มากกว่า GA ไม่พบลำดับเบสที่มีซ้ำแบบ GT นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในการศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกสายพันธุ์แก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ออกจากกันได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค ISSR มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ ด้วยวิธี UPGMA และนำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ พบว่าแก่นตะวันสายพันธุ์ AMES 2729 ถูกแยกออกมาจากกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งก็สอดคล้องกับข้อมูลโครโมโซมของ Roger et al. (1982) โดยแก่นตะวันสายพันธุ์ AMES 2729 ซึ่งเป็นพันธุ์ป่า ที่มีโครโมโซมเป็น 2n = 2x = 34 ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ ที่เป็นพันธุ์ปลูกที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = 6x = 102 และนอกจากนี้สามารถจำแนกกลุ่มที่มีผลผลิตสูง (สายพันธุ์ JA 89, HEL 335, KKU Ac 001, JA 102 และ HEL 66) และ สายพันธุ์ที่มีผลผลิตต่ำที่สุด (สายพันธุ์ JA 81) ออกจากแก่นตะวันกลุ่มที่เป็นพันธุ์ปลูกได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าค่า S.I. ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ตารางที่ 3) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.431 ถึง 0.929 มีค่าต่ำกว่าความเหมือนทางพันธุกรรมของพืชในสกุล Helianthus จำนวน 13 ตัวอย่างของ Kohler and Friect (1999) จากการใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิดที่ใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AP-PCR (Arbitrality Primer-Polymerase chane reaction) พบว่า ค่า

S.I. มีค่าอยู่ระหว่าง 0.839 ถึง 0.940 อาจเนื่องมาจากลูกผสมที่ได้มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูง ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างแก่นตะวันที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ อีกทั้งความแตกต่างของเบสที่เป็นองค์ประกอบของไพรเมอร์และจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้มีจำนวนน้อยกว่าในการศึกษาของ Kohler and Friect (1999) ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาเพิ่มมากขึ้น

จากงานวิจัยนี้อาจสรุปได้ว่าเทคนิค ISSR-PCR เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์จีโนมและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวันในระดับหนึ่ง โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลของจีโนมของแก่นตะวัน ซึ่งต้องอาศัยต้นทุนสูงในการทำวิจัย การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์เมื่อมีการนำสายพันธุ์จากแหล่งพันธุกรรมทั่วโลกมาคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูงและคุณภาพดีต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวิลาวรรณ ตุลา คุณรักชนก มีแก้ว และคุณจิรยุธ ดาเระสาและ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์แก่นตะวันสำหรับการสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับสถานที่และอุปกรณ์ตลอดการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki and T. Fugimura. 1997. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeat, and a classification of closely related cultivar with these microsatellite loci. Theoretical and Applied Genetics 94: 61-67.

Blair, M.W., O. Panaul and S.R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) Theoretical and Applied Genetics 98: 780-792.

Bornet, B. and M. Branchart. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) Marker: reproducible and specific tool for Genome Fingerprinting. Plant Molecular Biology Report 19: 209-215.

Camacho, F.J. and A. Liston. 2001. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (*Ophioglossaceae*) based on inter-simple sequence repeat (ISSR). American Journal of Botany 88: 1065-1070.

Chin, E.C.L, M.L. Senior, H. Shu and J.S.C. Smith. 1996. Maize simple repetitive DNA sequence abundance and allele variation. Genome 39: 873-886.

Depeiges, A., C. Golbely, A. Lenoir, S. Picard, M. Raynal, F. Greller and M. Delseny. 1995. Identification of the most reprecented repeated motif in Arabidopsis thaliana microsatellite loci. Theoretical and Applied Genetics 91: 160-168.

Dow, B.D., M.V. Ashley and H.F. Move.1995. Characterization of highly variable (GA/CT)n microsatellite in the burr oak, Quercus macrocarpa. Theoretical and Applied Genetics 91: 137-141.

Fang, D.Q. and M.L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter simple sequence repeat genetics. Theoretical and Applied Genetics 95: 408-417.

Gentzbittel, L., A. Perrault and P. Nicolas. 1992. Molecula phylogeny of the *Helianthus genus,* based on nuclear restriction fragment length polymorphism (RFLP). Molecular Biology and Evolution 9: 872-892.

Gupta, M., Y.S. Chyi, J. Ronero-Severson and J.L. Owen. 1994. Amplification of DNA marker from evolutionary diverse genome using single-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics** 89: 998-1006

Hu, J. and C.F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD marker. Plant Cell Reporter 33:90-93.

Jain, N., A.K. Shasany, V. Sundaresan, S. Rajkuma, M.P. Daroka, G.D. Bagchi, A.K. Gupta, S. Kumar and S.P.S. Khanija. 2003. Molecular diversity in Phylanthus anarus assessed through RAPD analysis. Current Science 85(10): 1454-1458.

Kantety, R.V., X. Zeng, J. Bennetzen and B.E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent popcorn (Zea mays L.) inbred lines using inter-simple sequence repeats (ISSR) amplification. Molecular Breeding 1: 365-373.

Kohler, H and W. Friedt. 1999. Genetic variability as identified by AP-PCR and reaction to mid-stem infection of Scerotina scerotiolum among interspecific sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrid progenies. Crop Science 39: 1456-1463.

Munthali, M., V.D. Ford-Lioyd and H.J. Newbury. 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fringerprinting plant. PCR Method and Applications 1: 274-276.

Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeats polymorphisms in wheat for use as DNA marker in comparison to RFLP and RAPD marker. Theoretical and Applied Genetics 94: 597-602

Nan, P., S. Shi, S. Peng, C. Tian and Y. Zhong. 2003. Genetic diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from central and south-west china as revealed by ISSR marker. Annals of Botany 91: 329-333.

Rogers, C.E., T.E. Thompson and G.J. Seiler. 1982. Sunflower species of the United State. National Sunflower Association, Kaye's Inc., Fargo, North Dakota.

Ruas, M.P., C.F. Raus, L. Rampin, V.P. Carvalho, E.A. Ruas and T. Sera. 2003. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (inter-simple sequence repeats) markers. Genetic and Molecula Biology 26(3): 319-327.

Salimath, S.S., A.C. De Oliverira, I.D. Godwin, and J.L. Bennetzen. 1995. Assesment of genomic origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA marker. **Genome** 38: 757-763.

Tai, Q. and C. Tanksley. 1990. A rapid and inexpensieve method for isolation of total DNA from dehydrated plant. Plant Molecular Biology Report 8: 297-303.

Tsumura, Y., K. Ohba and S.H. Stuauss, 1996. Diversity and inheritance of inter simple sequence repeat polymorphism in dougas-fir (*Psudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). Theoretical and Applied Genetics 92: 40-45.

Van Damme, J.M., A. Barre, A. Mazard, P. Verhaert, A. Horman, H. Debray, P. Rouge and W.J. Peumans. 1999. Charaterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus Tuberosus*. European Journal of Biochemistry 259: 135-142.

var der Meer, I.M., A.J. Koopa, J. C. Hakkert and A. J. van Tunen. 1998. Cloning of fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. The Plant Journal 15(4): 489-500.

Vos, P., R. Horger, M., Breeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijter, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. A new technique for DNA fringerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.

Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong and S.D. Tankley. 1994. Survey of plant short tandem DNA report. Theoretical and Applied Genetics 88: 1-6

Wolfe, A.D. and A. Liston. 1998. Contributions of PCR-base methods in plant systematic and evolutionary biology. 43-86. In: Soltis, P.S., Soltis E.d. and Doyle, J.J., eds. Molecular Systematics of Plants: DNA Sequencing. Kluwer, New York.

Wolfe, A.D. and C.P. Randle. 2000. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaeae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. Systematic Botany 26: 120-130.

Wu, K. and S.D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellite in rice. Molecular and General Genetics 241: 225-235.

Yep, I.V. and R.J. Nelson. 1996. Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. International Rice Research Institute, Philippines.

Zietkiewicz, E., R.D. Yang, Z. Ye and J.M. Xiyam. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. Genomics 20: 176-183.

Ziyan, E. and S. Pekyadimci. 2001. Charaterization of polyphenol oxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). Turkish Journal of Chemistry 27(2003): 217-225.