การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์ในไม้สะเดา (*Azadirachta* spp.)

Development of Microsatellite Markers in Neem (*Azadirachta* spp.)

จันทร์เพ็ญ บุญทอง[1] สุจิตรา จางตระกูล[2]
Chanpen Boonthong Suchitra Changtragoon

Abstract

Diversity evaluation of neem genetic resource is important for using as criteria for conservation program and management. Highly polymorphic DNA markers are useful for genetic diversity analysis. Therefore the development of microsatellite markers in neem is needed because of their high polymorphism and co-dominant inheritance which are suitable for using in the study of genetic diversity, mating system and gene flow between populations. For this experiment, the DNA fragments were hybridized with oligonucleotide $(CT)_{10}$ and the fragments containing microsatellites were separated magnetically by using MagneSphere®. According to the sequencing analysis, the results showed that 68 and 47 (69.12%) of clones from the genomic libraries contained microsatellite motifs including CT/TC 16 fragments, AG/GA 20 fragments, AT/TA 2 fragments and CA/AC 9 fragments. The average length of microsatellite motif was 12 (24 bp). The shortest motif was $(TA)_3$ and the longest motifs was $(GA)_{24}$. The average length of fragment containing microsatellite was 222 bp. Twenty-six microsatellite sequences were selected for primer design by using primer 3 software (Rozen and Skaletsky, 2000). After testing 26 primers, the results revealed that 8 primers showed polymorphism. The number of alleles per locus ranged from 4 to 9 with the average of 7.125.

Key words: *Azadirachta* spp., neem, microsatellite markers

บทคัดย่อ

การประเมินสถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพและแหล่งพันธุกรรมของไม้สะเดา มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการพิจารณาวางแผนอนุรักษ์และบริหารจัดการไม้สะเดาอย่างมีคุณภาพ การใช้ DNA markers ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง จะเป็นประโยชน์ต่อการนำมาศึกษาวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สะเดา ซึ่งการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์ในไม้สะเดามีความสำคัญ เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอมาร์ก

[1] นิสิตปริญญาโท สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
[2] นักวิชาการป่าไม้ 8ว สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช

เกอร์ที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงและแสดงให้เห็นสภาพข่มร่วมกัน จึงมีประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ระบบการสืบพันธุ์ การเคลื่อนย้ายและการถ่ายเทของยีนระหว่างประชากร ในการทดลองนี้ได้พัฒนาไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์ โดยการทำไฮบริไดซั่นด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ $(CT)_{10}$ และใช้ MagneSphere® (Magnetic Separation) ในการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีส่วนของของไมโครแซทเทลไลท์อยู่ และนำชิ้นส่วนที่ได้ไป sequence เพื่อหาลำดับเบสและออกแบบไพรเมอร์ จากการหาลำดับเบสทั้งหมด 68 ชิ้นดีเอ็นเอ พบส่วนที่มีไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 47 ชิ้น (69.12%) ซึ่งเป็นชุดซ้ำ AG/GA 20 ชิ้น CT/TC 16 ชิ้น, CA/AC 9 ชิ้น, และ AT/TA 2 ชิ้น โดยมีความยาวเฉลี่ยของชุดซ้ำเท่ากับ 12 ชุดซ้ำ (24 bp) โดยชุดซ้ำที่สั้นที่สุดคือ $(TA)_3$ และชุดซ้ำที่ยาวที่สุดคือ $(GA)_{24}$ ความยาวโดยเฉลี่ยของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 222 bp จากการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) พบว่าจากทั้งหมด 47 ชิ้นดีเอ็นเอ สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 26 (55%) คู่ไพรเมอร์ และจากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้ง 26 คู่ พบว่ามี 8 คู่ไพรเมอร์ที่มี polymorphism ตำแหน่งที่ให้อัลลีลต่ำสุดคือ 4 อัลลีล และตำแหน่งที่ให้อัลลีลสูงสุดคือ 9 อัลลีล โดยมีค่าเฉลี่ยของอัลลีลเท่ากับ 7.125 อัลลีลต่อตำแหน่ง

คำสำคัญ : ไม้สะเดา ไมโครแซทเทลไลท์มาร์กเกอร์