

Li Li : CHARACTERIZATION OF GENETIC IDENTITIES AND

RELATIONSHIPS AMONG *BRASSICA NAPUS* USING AFLP AND SSR.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHOKCHAI WANAPU, Ph.D., 111 PP.

GENETIC IDENTITIES/ RELATIONSHIPS/ AFLP/ SSR/ *BRASSICA NAPUS*

Rapeseed (*Brassica napus*) is one of the most important sources of vegetable oil in Guizhou, People's Republic of China. It occupies the largest cultivated area among *Brassica* species. During long term evolution and artificial selection, a large number of *B. napus* varieties were developed and identified through regional test. Therefore, accurate characterization of seed quality traits of each cultivar and knowledge of their genetic relationships are important for germplasm conservation and utilization. This study mainly attempted to reveal the genetic diversity and relationships among 25 *B. napus* cultivars using AFLP and SSR techniques. Two parts of experiment were conducted in this study. In the first part, a powerful technique AFLP was applied to assess genetic diversity and relationships among 25 *B. napus* cultivars. Nine AFLP primer combinations generated 193 fragments, of which 73 were polymorphic with polymorphic rate of 38%. Across all the varieties, the average observed number of alleles per locus was 3.56, while the mean effective number of alleles was 1.41. Gene diversity, Shannon's information index, and genetic differentiation were 0.25, 0.62, and 0.39, respectively. At a similarity coefficient of

0.66, these 25 *B. napus* cultivars were divided into three groups using UPGMA cluster analysis. The UPGMA analysis showed no apparent clustering by seed quality characteristics and original location. In the second part, SSR technique was used for evaluating genetic diversity and relationships among *B. napus* cultivars. Total 134 bands were generated with 11 SSR primer pairs, of which 54 bands were polymorphic with polymorphism rate of 40%. Twenty two alleles were detected with an average of 2.55 alleles per locus and an average of 2.01 effective alleles per locus. High mean fixation index (0.54) and expected heterozygosity (0.45) were observed among *B. napus* cultivars. The value of similarity coefficient among all *B. napus* cultivars was calculated in a range of 0.43 to 0.95, with an average of 0.69. The UPGMA cluster analysis showed that the rapeseed cultivars could be divided into three groups at a similarity coefficient of 0.63. UPGMA analyses based on AFLP and SSR genetic similarity coefficients found that two varieties, Huayouza 6 and Huayouza 9, could not be distinguished, suggesting a very close genetic relationship between them. Likewise, the genetic relationships among *B. napus* cultivars was not closely related to their original location, may be contributed to their similar parents or breeding program, although cultivars bred by the same institute have very high level of genetic similarity. All the parameters of genetic diversity were calculated using POPGENE 1.31 software and dendrograms based on genetic similarity coefficients were constructed using NTSYS-pc 2.10 software. This study demonstrated that the SSR technique was the best choice for the evaluation of

genetic diversity and relationships among *B. napus* cultivars. However, AFLP was an optimal method for DNA fingerprinting of *B. napus* germplasm.

School of Biotechnology

Academic Year 2010

Student's Signature \_\_\_\_\_

Advisor's Signature \_\_\_\_\_

หลี่ ลี : การจำแนกความแตกต่างกันทางพันธุกรรมและการหาความสัมพันธ์ของ  
*BRASSICA NAPUS* ด้วยเทคนิค AFLP และ SSR (CHARACTERIZATION OF  
GENETIC IDENTITIES AND RELATIONSHIP AMONG *BRASSICA NAPUS* USING  
AFLP AND SSR) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู, 111 หน้า.

*Brassica napus* เป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญในมณฑลกุ้ยโจ ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ซึ่งมีพื้นที่ในการเพาะปลูกมากกว่าสายพันธุ์อื่น ได้มีการพัฒนา และคัดเลือกสายพันธุ์ของ *B. napus* เพื่อให้เหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศ ภูมิประเทศของมณฑลกุ้ยโจ ดังนั้น ความแม่นยำในการกำหนดลักษณะของเมล็ดพันธุ์ เพื่อให้ทราบลักษณะของสายพันธุ์ตามที่ต้องการจึงมีความจำเป็นในการศึกษาครั้งนี้ โดยมุ่งเน้นในการตรวจสอบความหลากหลาย และลักษณะของสายพันธุ์ต่างๆ 25 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค AFLP และ SSR โดยใช้ primer 9 ชนิด พบว่าได้ซึ้นดีเอ็นเอ 193 ซึ้น จาก 73 polymorphic (38%) โดยค่าเฉลี่ยของยีนที่แสดงลักษณะเฉพาะในแต่ละชนิดมีค่าเท่ากับ 3.56 ในขณะที่ค่ามาตรฐานอยู่ที่ 1.41 และมีค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (gene) ค่าดัชนี Shannon index ค่าความแตกต่างของพันธุกรรมอยู่ที่ 0.25, 0.62 และ 0.39 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPGMA พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ที่คล้ายคลึงกันอยู่ที่ 0.67 และสามารถแบ่งพืชได้เป็น 3 กลุ่ม แต่พบว่าไม่มีความชัดเจนในการจัดกลุ่ม ตามการวิเคราะห์ด้านคุณภาพของเมล็ด เมื่อใช้เทคนิค SSR พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในแต่ละสายพันธุ์ ได้ทั้งหมด 134 แถบ โดยใช้ SSR primer จำนวน 11 สาย มีลักษณะ polymorphic จำนวน 54 แถบ (40%) ยีนที่มีบทบาททางพันธุกรรมจำนวน 22 สาย มี allele เฉลี่ย 2.55 allele/ locus และ effective allele เฉลี่ย 2.01 allele/ locus ค่า fixation index ที่ 0.54 และ heterozygosity ที่ 0.45 ค่า similarity efficient จากการคำนวณในช่วง 0.43 – 0.95 โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.69

เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPGMA ทั้งเทคนิค AFLP และ SSR พบว่าสามารถจำแนกพืชได้ ยกเว้นสายพันธุ์ Huayouza6 และ Huayouza9 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนั้น ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชน้ำมันที่ทำการศึกษามีความแตกต่างกันเล็กน้อยกับพืชน้ำมันจากแหล่งกำเนิด ทั้งนี้เนื่องมาจาก ความคล้ายคลึงกันของพ่อแม่ โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืช และพืชที่มาจากแหล่งเดียวกันจึงทำให้มีความเหมือนกันทางพันธุกรรม นอกจากนี้ เมื่อนำตัวแปรของพันธุกรรมทั้งหมดมาคำนวณด้วยโปรแกรม POPGENE1.31 และ NTSYS-PC 2.10 พบว่า SSR เป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุดในการจำแนกความหลากหลายทาง

พันธุกรรม รวมถึงความสัมพันธ์ของ *B. napus*. อย่างไรก็ตามเทคนิค AFLP ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอใน germplasm ของ *B. napus*