

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ILP เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรในสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.)

Development of ILP Marker to Assess Genetic Diversity and Population Structure of *Jatropha curcas* L.

นายวชิร สายสุข และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

ข้อมูล expressed sequence tags (ESTs) สามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้หลายชนิด ในการศึกษา นี้เป็นการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ intron length polymorphism (ILP) จากการทำนายตำแหน่งอินทรอนทั้งหมด 153 อินทรอน จากข้อมูลลำดับเบส EST ของมันสำปะหลัง 30,401 ESTs รวม 386,403 bp โดยเทียบกับข้อมูล ลำดับเบสจีโนมจากมันสำปะหลัง และออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 112 ไพรเมอร์ จากบริเวณของเอ็กซอนที่มี ลักษณะอนุรักษ์ซึ่งครอบคลุมบริเวณของอินทรอนอยู่ โดย 71 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ ตำแหน่งเดียว และได้นำมาใช้เป็นเครื่องหมาย ILP ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้าง ของกลุ่มประชากรสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) 59 ตัวอย่าง เครื่องหมาย ILP นี้ สามารถตรวจพบแอลลีลทั้งหมด 152 แอลลีล มีค่า PIC (polymorphism information content) เฉลี่ย 0.35 จากวิเคราะห์การจัดกลุ่มตัวอย่างสบู่ดำ สามารถ จัดกลุ่มได้ 6 กลุ่มหลัก สอดคล้องกับแหล่งที่มาของตัวอย่าง ค่า coefficient of gene differentiation และ gene flow index แสดงให้เห็นว่าระดับของความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรทั้ง 6 กลุ่ม ก่อนข้างคำ ผลของ analysis of molecular variance พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมส่วนใหญ่ (97%) อยู่ภายในกลุ่มประชากร ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการเชื่อมต่อของกันของความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรย่อย เครื่องหมาย ILP ที่ พัฒนาจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ภายในสปีชีส์ *J. curcas* ได้

คำสำคัญ : สบู่ดำ ความหลากหลายทางพันธุกรรม ไอแอลพี

Abstract

A large number of expressed sequence tags (ESTs) are available and has facilitated the development of molecular markers in many plant species. In the present study, intron length polymorphism (ILP) markers were developed *in silico* from EST sequences and genomic sequence of cassava. Of 153 predicted introns, 112 primer pairs were designed to conserved exonic regions flanking introns, using 30,401 cassava unique transcripts alignments to 386,403 bp cassava genomic sequences. Of total primers, 71 primer pairs gave single-copy loci for ILP markers and were selected to assess genetic diversity and population structure of 59 *Jatropha curcas* accessions. A total of 152 alleles were detected by ILP markers. Average PIC (polymorphism information content) was 0.35. The cluster analysis revealed six groups based on geographic sources or origins of collection. The coefficient of gene differentiation and gene flow index indicated relatively low level of genetic differentiation among the six groups. Analysis of molecular variance showed that the majority (97%) of genetic diversity was within populations indicating a high level of overlapping and little population subdivision with respect to geographic area. ILPs developed in the present study have been proved to be alternative molecular markers used for studying genetic diversity within species *J. curcas*.

Keywords: *Jatropha*, genetic diversity, intron length polymorphism (ILP)

1. บทนำ

อินตรอน (intron) เป็นส่วนของยีนที่ไม่มีการแปลรหัส มีการกระจายตัวอยู่ทั่วทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิต เมื่อเทียบกันบริเวณเอ็กซอน (exon) แล้วอินตรอนจะมีความหลากหลายมากกว่า เพราะในการคัดเลือกโดยธรรมชาติแล้วในบริเวณที่เป็นอินตรอนจะมีความอนุรักษ์น้อยกว่าบริเวณที่เป็นเอ็กซอน [1] ดังนั้นบริเวณนี้จึงสามารถมีความหลากหลายได้มาก ตัวอย่าง เช่น ค่าเฉลี่ยของจำนวน SNPs ต่อ 1000 bp ในอินตรอน (12.1) มีมากกว่าเอ็กซอน (3.6) ถึง 3 เท่าระหว่างข้าว 8 สายพันธุ์ [2] ความหลากหลายของขนาดนั้นพบมากในบริเวณอินตรอน ดังนั้น intron length polymorphism (ILP) จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ [3,4,5,6] ILP สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะต่อบริเวณเอ็กซอนที่คร่อมส่วนที่คาดว่าเป็นอินตรอน [5] ซึ่งวิธีพื้นฐานที่ใช้ทำนายตำแหน่งของอินตรอน คือการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง cDNA หรือ expressed sequence tags (ESTs) กับลำดับเบสของจีโนม ดังนั้นจึงสามารถระบุตำแหน่งที่เป็นอินตรอนได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด

ข้อมูลของลำดับเบส EST และจีโนมของพืชในพืชวงศ์ Euphorbiaceae ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) มีข้อมูลลำดับเบส EST และลำดับเบสจีโนมมากที่สุด อีกทั้งยังมีระดับของความสามารถในนำข้อมูลพันธุกรรมมาใช้ในสับดูค่าที่ค่อนข้างมาก [7] จากข้อมูลดังกล่าว จึงสามารถพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในสับดูค่า ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเอ็กซอนที่คร่อมส่วนของอินตรอน โดย

ใช้ข้อมูลจากการเปรียบเทียบลำดับเบส EST และ จีโนมของมันสำปะหลัง เครื่องหมาย ILP ที่ได้จะ นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทาง พันธุกรรมของสนุ่นดำทั้ง 59 ตัวอย่าง เพื่อศึกษา โครงสร้างพันธุกรรม เพิ่มความเข้าใจ และใช้ ประโยชน์ในการเก็บรวบรวมพันธุ์สนุ่นดำสำหรับ โครงการปรับปรุงพันธุ์

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 ตัวอย่างสนุ่นดำ

ตัวอย่างสนุ่นดำที่ใช้ในการศึกษาค้นนี้มี 59 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 42 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมมาจากพื้นที่ที่มีสภาพภูมิประเทศแตกต่างกัน 4 แบบ ใน ประเทศไทย และอีก 17 ตัวอย่าง มาจาก 9 ประเทศ ใน 4 ทวีป รวมกับตัวอย่างสนุ่นแดง (*J. gossypifolia*) 1 ตัวอย่าง ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (ตารางที่ 1) นำไป อ่อนแต่ละตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) ของ Gawel and Jarret (1991) [8] และตรวจสอบคุณภาพและความ เข้มข้นของ ดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และ spectrophotometric ตามลำดับ สุดท้ายจึงเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น พอเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ดีเอ็นเอ

2.2 การพัฒนาเครื่องหมาย ILP

ข้อมูลลำดับเบสจีโนมของมันสำปะหลัง ถูกดาวน์โหลดมาจากฐานข้อมูล Phytozome V5.0 (<http://www.phytozome.net/soybean>) และข้อมูล ลำดับเบส PUT (PlantGDB-assembled Unique Transcript) ของมันสำปะหลังถูกดาวน์โหลดมาจาก ฐานข้อมูล PlantGDB (<http://www.plantgdb.org>). เหตุผลที่เลือกใช้ข้อมูลมันสำปะหลังมาใช้ใน

การศึกษาค้นครั้งนี้ เพราะมันสำปะหลังมีการวิวัฒนาการ ใกล้ชิดกับสนุ่นดำ มีจำนวนข้อมูลลำดับเบส EST มาก ที่สุด และเป็นสปีชีส์ในวงศ์ Euphorbiaceae ที่มี การศึกษามากที่สุด การทำนายตำแหน่งของอินทรอน และการออกแบบไพรเมอร์ ILP นั้นจะทำตามวิธีของ Yang *et al.* (2007) [9] ซึ่งมีขั้นตอน คือ นำข้อมูล coding sequence ของมันสำปะหลังมาทำการ alignment กับ ลำดับเบสจีโนมของมันสำปะหลังโดย ใช้โปรแกรม GeneSequer [10] เพื่อให้ได้ข้อมูล ตำแหน่งและความยาวอินทรอน ของมันสำปะหลัง จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง ของเอ็กซอนที่ครอบคลุมส่วนของตำแหน่งที่คาดว่าจะ เป็น อินทรอนอยู่ ด้วยโปรแกรม Primer3 [11] เพิ่มปริมาณ ซีนติเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ 20 μ l ซึ่ง ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 50 ng, 1X PCR buffer (20 mM Tris pH 9.0, 100 mM KCl, 3.0 mM MgCl₂), dNTPs ทั้ง 4 ชนิด 400 μ M, ภูไพรเมอร์อย่างละ 0.4 μ M และ Taq DNA polymerase 1 Unit และใช้สภาวะ ในการทำพีซีอาร์ 94°C 1 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ 94°C 30 วินาที, (45-57°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72°C 5 นาที หลังจากการทำ พีซีอาร์ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ด้วย agarose gel 1.5% และ denaturing polyacrylamide gel 6% และย้อมด้วยสารย้อมเงิน [12]

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

การคำนวณ genetic diversity parameters ของข้อมูลจีโนมไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดย ใช้โปรแกรม PowerMarker [13] (<http://www.powermarker.net>) ประกอบด้วยค่าจำนวนจีโนมไทป์ (NG), จำนวนแอลลีล (NA), gene diversity (GD), heterozygosity (H), และ polymorphism information content (PIC) การคำนวณ pair-wise genetic distance

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสับุด้า (Jatropha) ที่ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างประชากร

Geographic origin	Accession identity	Sources	Accession number
Northern Thailand (N)	N-PH	Phrae	2 (1-2)
	N-LM	Lampang	4 (3-6)
	N-CM	ChiangMai	6 (7-12)
	N-NA	Nan	1 (13)
	N-SU	Sukhothai	1 (14)
	N-TK	Tak	1 (15)
Northeastern Thailand (NE)	NE-LE	Loei	1 (16)
	NE-MH	Mukdahan	2 (17-18)
	NE-NR	Nakhon Ratchasima	1 (19)
	NE-CP	Chaiyaphum	2 (20-21)
Central Thailand (C)	C-NS	Nakhon Sawan	2 (22-23)
	C-PT	Pathum Thani	3 (24-26)
	C-CN	Chai Nat	1 (27)
	C-UT	Uthai Thani	1 (28)
	C-NP	Nakhon Pathom	7 (29-35)
	C-KB	Kanchanaburi	3 (36-38)
Central Thailand (C)	C-NS	Nakhon Sawan	2 (22-23)
	C-PT	Pathum Thani	3 (24-26)
	C-CN	Chai Nat	1 (27)
	C-UT	Uthai Thani	1 (28)
	C-NP	Nakhon Pathom	7 (29-35)
	C-KB	Kanchanaburi	3 (36-38)
Southern Thailand (S)	S-ST	Satun	2 (39-40)
	S-NT	Nakhon Si Thammarat	1 (41)
	S-PL	Phatthalung	1 (42)
Asia	A-I	India	3 (43-45)
	A-V	Vietnam	1 (46)
	A-M D2	D2 Myanmar	1 (47)
	A-M Mague	Mague Myanmar	1 (48)
	A-M Namlat	Namlat Myanmar	1 (49)
	A-M Rwar-Ngn	Rwar-Ngn Myanmar	1 (50)
	A-M Tanngue	Tanngue Myanmar	1 (51)
	A-M ync-36	ync-36	1 (52)
	A-L	Lao	1 (53)
	A-S	Sri Lanka	1 (54)
America	USA	USA	2 (55-56)
	Mexico	Mexico	2 (57-58)
Africa	Senegal	Senegal	1 (59)
Outgroup species	<i>J. gossypifolia</i>	Thailand	1

ระหว่างตัวอย่างคำนวณจากค่า similarity coefficients [14] ผลที่ได้จะถูกนำมาสร้างเป็น dendrogram ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดจะถูกประมวลผลจากโปรแกรม NTSYS-PC V2.0 [15] genetic variability parameters ระหว่างกลุ่มประชากร จะวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PopGen [16] ซึ่ง parameter ต่างๆ ประกอบด้วย จำนวนแอลลีล (Na), จำนวนของ effective alleles (Ne), ค่า heterozygosity ที่คาดหวัง (He), และ Shanon genetic diversity index (I), gene diversity รวม (Ht), gene diversity ในกลุ่มประชากร (Hs), และ coefficient of gene differentiation (Gst) ค่า Gene flow (Nm) ประเมินจากสูตร $Nm=0.5(1-G_{ST})/G_{ST}$ [17] การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรใช้การวิเคราะห์ analysis of molecular variance (AMOVA) [18] ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN 3.0 ค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรม แบ่งเป็นค่าระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่มประชากร โดยใช้ 1000 random permutation ในการทดสอบระดับนัยสำคัญ และสุดท้ายใช้ค่า F_{ST} (phi-statistic; ϕ_{ST}) ที่ได้จากการคำนวณ AMOVA เป็นตัววัด genetic distance ระหว่างกลุ่มประชากร และสร้าง dendrogram จากค่า F_{ST} matrix นี้ ด้วยการจัดกลุ่มแบบ UPGMA

3. ผลการทดลอง

3.1 การทำนายตำแหน่งอินทรอนและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ILP

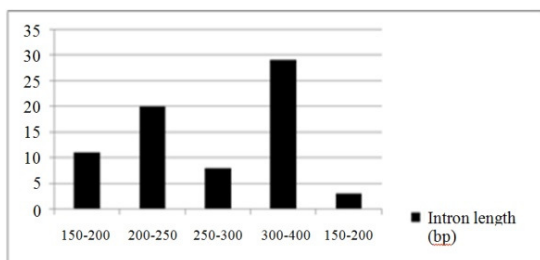
เปรียบเทียบลำดับเบสของ PUT และ จีโนมของมันสำปะหลังด้วยโปรแกรม Geneseqer เพื่อค้นหาจำนวนของอินทรอนและตำแหน่ง splice site จากการเปรียบเทียบ 30,401 PUT จากมันสำปะ-

หลังกับลำดับเบสจีโนม 386,403 คู่เบส มีอินทรอนทั้งหมด 153 อินทรอน ที่สามารถระบุได้ อินทรอนที่ถูกเลือกมาใช้ในการพัฒนาเครื่องหมาย ILP มีขนาดตั้งแต่ 47-9,369 คู่เบส โดยเฉลี่ย 613.66 คู่เบส จากจำนวนอินทรอนทั้งหมดที่ทำนายได้ มี 133 อินทรอน ที่มีขนาดของเอ็กซอนข้างเคียงยาวพอที่จะออกแบบไพรเมอร์ ILP ได้ โดยอินทรอนที่มีความยาวมากเกินไปจะทำให้การวิเคราะห์จีโนมที่มีความคลาดเคลื่อนเนื่องจากข้อจำกัดของความสามารถแยกความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะอินทรอนที่มีขนาดเล็กกว่า 1,000 คู่เบส มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดแถบดีเอ็นเอ จากทั้งหมด 133 ILP ไพรเมอร์ ที่ออกแบบมา มี 112 ไพรเมอร์ ที่เลือกไปสังเคราะห์และใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของจีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างสำเนาทั้ง 7 ตัวอย่าง และตัวอย่างสำเนาแดงอีกหนึ่งตัวอย่าง จากจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมดที่ถูกทดสอบ มี 63.4% (71/112) ไพรเมอร์ ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีคุณภาพดี สามารถแยกในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสได้อย่างชัดเจน จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสามารถใช้ในการถ่ายโอนสู่สำเนาได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ มีไพรเมอร์สี่คู่ (4.5%) สร้างดีเอ็นเอหลายแถบ ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ จึงคัดไพรเมอร์เหล่านั้นออกจากไพรเมอร์ 71 คู่ ที่ถูกคัดเลือกมา มีไพรเมอร์ 57 คู่ ให้โพลิมอร์ฟิซึมใน 7 ตัวอย่าง สำเนาที่สุ่มเลือกมา ซึ่งได้ถูกนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมกับตัวอย่างสำเนาทั้งหมดต่อไป อินทรอนที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทั้ง 71 คู่ มีขนาดตั้งแต่ 153-481 คู่เบส โดยเฉลี่ย 284.32 คู่เบส และส่วนมาก (88.73%) มีขนาด

เล็กกว่า 400 คู่เบส (รูปที่ 1) อัตราการถ่ายโอนของ ILP ไพรมเมอร์จากมันสำปะหลังสู่สนุ่นแดง (*J. gossypifolia*) มี 73% (66/112) จากผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า อินทรอนในสนุ่นดำส่วนใหญ่ที่ทำนายมีความถูกต้อง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำนายตำแหน่งของอินทรอนในสนุ่นดำโดยอ้างอิงจากพืชต้นแบบในวงศ์ Euphorbiaceae เช่น มันสำปะหลังนั้นค่อนข้างมีประสิทธิภาพกับจีโนม *Jatropha*

ตารางที่ 2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

	<i>J. curcas</i>	<i>J. gossypifolia</i>
PCR success rate	75 (84.0%)	66 (73.9%)
PCR failure rate	37 (16.0%)	46 (26.1%)
Good quality PCR product	71 (79.5%)	66 (73.9%)
Multiple band PCR product	4 (4.5%)	0 (0.0%)
Polymorphism rate	57 (63.8%)	



รูปที่ 1 การกระจายตัวขนาดของอินทรอน

3.2 ความแปรปรวนของแอลลีลที่ได้จาก ILP

จากการวิเคราะห์ ILP ทั้ง 57 เครื่องหมาย แอลลีลทั้งหมด 152 แอลลีล มีจีโนมไทป์ทั้งหมด 164 จีโนมไทป์ จำนวนแอลลีลและจำนวนจีโนมไทป์มีตั้งแต่ 2-5 และ 2-7 โดยเฉลี่ย 2.67 ± 0.81 และ 2.88 ± 1.05 ตามลำดับ ค่า PIC มีตั้งแต่ 0.06-0.58 เฉลี่ย 0.35 ± 0.10

และค่าความหลากหลายของยีนตั้งแต่ 0.07-0.65 โดยเฉลี่ย 0.44 ± 0.14 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความแปรปรวนแอลลีลของเครื่องหมาย ILP 57 เครื่องหมายในสนุ่นดำ 59 ตัวอย่าง

	NG	NA	GD	PIC
Mean	2.88	2.67	0.44	0.35
Max	7	5	0.65	0.58
Min	2	2	0.07	0.06
Total	164	152		

NG = number of genotypes

NA = number of allele

GD = gene diversity

PIC = Polymorphism information content

3.3 ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรสนุ่นดำที่ประเมินจากเครื่องหมาย ILP มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตั้งแต่ 0.41 [ระหว่าง CP (NE5) กับเม็กซิโก] ถึง 1.00 [ระหว่าง NP (C10) กับ NP (C13)] เฉลี่ย 0.72 Dendrogram ถูกสร้างขึ้นเพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างสนุ่นดำโดยใช้การวิเคราะห์แบบ UPGMA ซึ่งสนุ่นแดงถูกแยกออกมาด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเท่ากับ 0.42 และไม่จัดเข้ากับกลุ่มตัวอย่างสนุ่นดำใดๆ เลย การจัดกลุ่มแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่มาจากต่างประเทศส่วนใหญ่จะถูกแยกกลุ่มออกจากประเทศไทย โดยตัวอย่างจากเม็กซิโกที่ไม่มีพิช (มีสาร probal ester อยู่ในระดับต่ำ) ถูกจัดกลุ่มแยกจากตัวอย่างจากประเทศอื่นๆ Dendrogram ยัง

แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ได้จากเอเชีย ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างจากพม่า (Tanngue, D2, Rwar-Ngn) เวียดนาม ลาว และอินเดียถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนกลุ่มตัวอย่างของประเทศไทยมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสัมพันธ์กับพื้นที่ภูมิประเทศ (รูปที่ 2)

3.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมในสปีด้า

ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของสปีด้าถูกกำหนดเป็น 6 กลุ่ม สัมพันธ์กับภูมิภาคของแหล่งที่มาของตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ความหลากหลายทางพันธุกรรมจะถูกคำนวณทั้งระหว่างและภายในกลุ่ม เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายที่มีโพลิมอร์ฟิซึมในแต่ละกลุ่มมีตั้งแต่ 84.51% (ภาคใต้) ถึง 90.14% (ภาคเหนือ) โดยเฉลี่ย 96.71% ค่า Nei's genetic diversity (He) และค่า Shannon index (I) มีตั้งแต่ 0.39-0.46 และ 0.51-0.61 มีค่าเฉลี่ย 0.43 และ 0.60 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่รวบรวมมานั้นมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างกว้างภายในกลุ่ม กลุ่มประชากรที่มีค่า genetic diversity สูงที่สุดคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และต่ำที่สุดคืออเมริกาและแอฟริกา ถึงแม้ว่าทั้งสองกลุ่มจะประกอบด้วยจำนวนตัวอย่างที่เท่ากัน ซึ่งสัมพันธ์กับค่า ne (effective number of allele) โดยกลุ่มตะวันออกเฉียงเหนือมีค่าสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนของขนาดตัวอย่างระหว่างกลุ่มประชากร (4-17 ตัวอย่างต่อกลุ่ม) ไม่มีความสัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรหรือภายในกลุ่มประชากร และค่า Gst (coefficient of gene differentiation) เท่ากับ 0.06 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ซึ่งสอดคล้องกับค่า Nm

(gene flow index) ที่ค่าค่อนข้างมาก (3.64) แสดงถึงการถ่ายเทแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างประชากรในอัตราสูง

ตารางที่ 4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรทั้ง 6 กลุ่ม โดยวิเคราะห์จากเครื่องหมาย ILP

Group	n	na	ne	He	I
North	15	2.11	1.84	0.43	0.61
Northeast	6	1.97	1.85	0.46	0.61
Central	17	1.95	1.82	0.42	0.59
South	4	1.90	1.80	0.46	0.58
Asia	11	2.18	1.77	0.40	0.59
USA and Africa	6	1.88	1.70	0.39	0.51
Total	59	2.47	1.84	0.43	0.60
SD		0.12	0.06	0.03	0.04
	Ht	Hs	Gst	Nm	
	0.42	0.42	0.06	3.64	

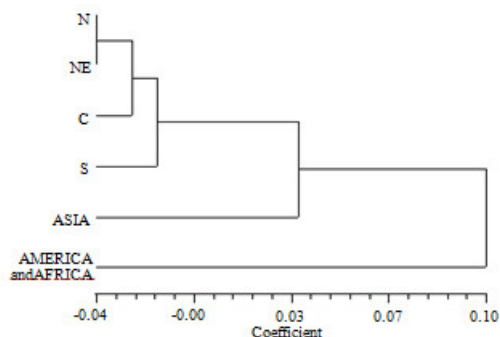
- Na = Number of alleles
- ne = Number of effective alleles
- He = Nei's genetic diversity
- I = Shannon index
- Ht = Total gene diversity
- Nm = gene flow index
- Gst = coefficient of gene differentiation

3.5 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรสปีด้า *J. curcas*

จากการแบ่งตัวอย่างสปีด้าทั้ง 59 ตัวอย่าง เป็น 6 กลุ่ม ตามภูมิภาคและแหล่งที่มาของตัวอย่าง แล้วประเมินค่า F_{st} ระหว่างคู่ของกลุ่มประชากร (ตารางที่ 5) พบว่าค่า F_{st} ระหว่างกลุ่มภาคเหนือกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ($F_{st} = -0.04052$) และระหว่างกลุ่มภาคเหนือกับกลุ่มภาคกลาง ($F_{st} =$

-0.023) มีระดับที่ต่ำและไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ค่า F_{st} ที่ติดลบนี้ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างสมาชิกภายในกลุ่มประชากรที่มากกว่าระหว่างกลุ่มประชากร ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีระดับของ gene flow อย่างไม่จำกัด ซึ่งหมายถึงประชากรทั้งสามนี้ไม่สามารถแยกเป็นกลุ่มประชากรย่อยได้ ในขณะที่ค่า F_{st} ระหว่างกลุ่มประชากรภาคกลางกับอเมริกาและแอฟริกามีค่าเท่ากับ 0.1406 แสดงถึงการเกิด gene flow ที่จำกัด ซึ่งหมายถึงกลุ่มประชากรนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยใช้ค่า genetic identity ด้วยวิธี UPGMA ได้ dendrogram ดังรูปที่ 3 แสดงถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับภูมิภาคและแหล่งที่มาของตัวอย่าง โดยมีการแยกตัวของกลุ่มเอเชียและอเมริกากับแอฟริกาจากกลุ่มประเทศไทยอย่างชัดเจน ค่า coefficient of genetic differentiation ระหว่างกลุ่มประชากร (G_{ST}) เท่ากับ 0.06 ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ AMOVA แสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมส่วนใหญ่อยู่ภายในกลุ่มประชากร 96.86% (ตารางที่ 6) โดยพันธุกรรมมีการเคลื่อนย้ายกันมากระหว่างกลุ่มประชากรย่อยๆ

ในพื้นที่ภูมิภาคที่ใกล้เคียงกันของแหล่งที่มาของตัวอย่างสุนัข



รูปที่ 3 Dendrogram ที่สร้างจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรทั้ง 6 กลุ่ม

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

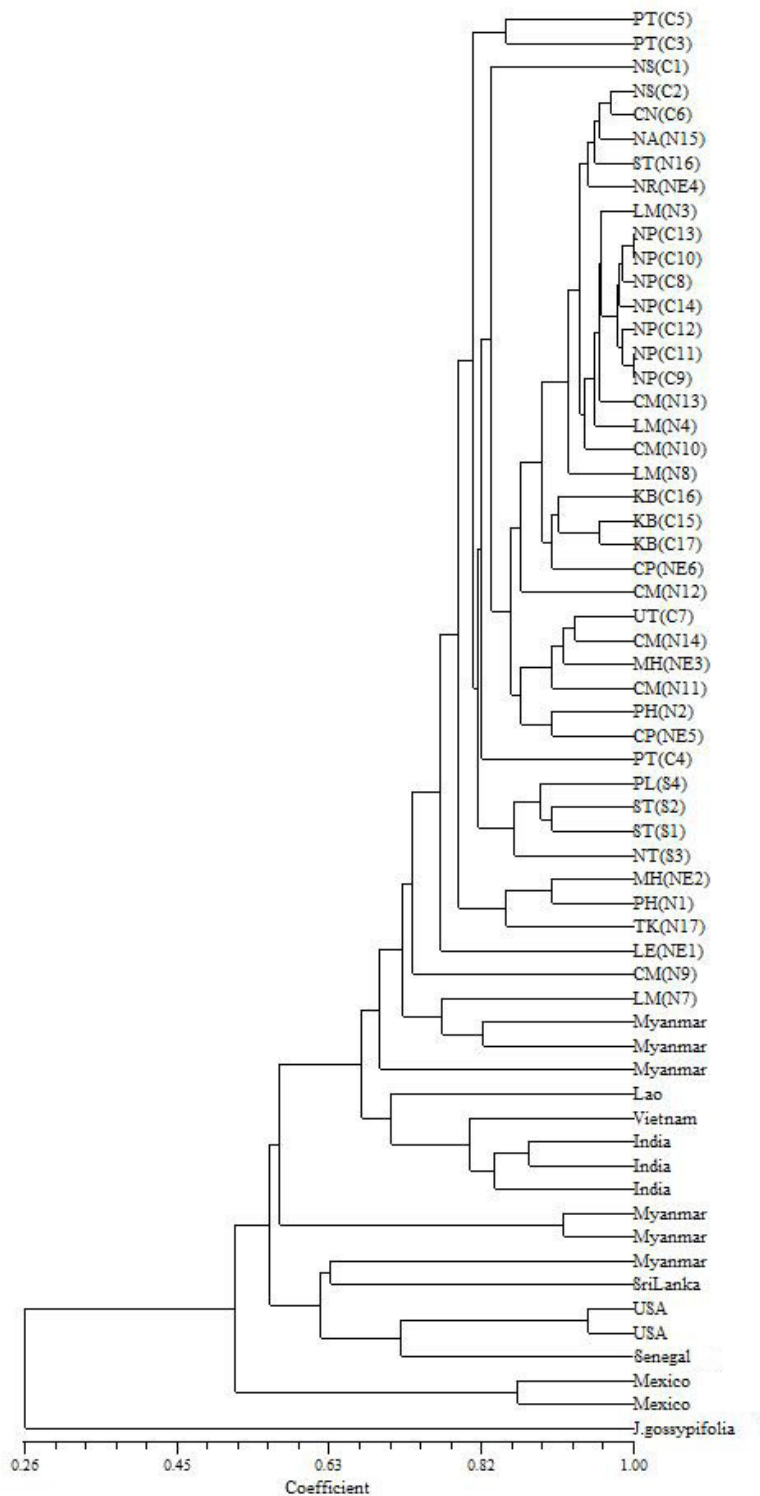
4.1 เครื่องหมาย ILP

เครื่องหมาย ILP ถูกออกแบบให้อยู่บนบริเวณของเอ็กซอนที่ครอบคลุมส่วนของอินทรอนอย่างน้อยหนึ่งอินทรอน ซึ่งอาจมีหรือไม่มีลำดับเบสซ้ำ microsatellite อยู่ก็ได้ โดยการเกิดวิวัฒนาการที่บริเวณอินทรอนนี้มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตน้อยกว่าการเกิดที่บริเวณเอ็กซอน [19] ดังนั้นจึงเป็นบริเวณที่มี

ตารางที่ 5 ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (ส่วนบนตาราง) และค่า F_{st} (ส่วนล่างตาราง) วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ILP

Groups	North	Northeast	Central	South	Asia	USA/Africa
North	-	0.9891	0.9946	0.9591	0.9511	0.9095
Northeast	-0.0405 ^{ns}	-	0.9855	0.9550	0.9423	0.9040
Central	-0.0230 ^{ns}	-0.0309	-	0.9565	0.9393	0.8962
South	-0.0113	-0.0376	-0.0043	-	0.9325	0.9000
Asia	0.0351	0.0242	0.0534	0.0254	-	0.9597
USA/Africa	0.1218	0.1044	0.1406	0.1128	0.0425	-

^{ns} not significant at $p<0.05$



รูปที่ 2 Dendrogram แสดงความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ

ตารางที่ 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) ระหว่างและภายในกลุ่มประชากร
ทั้ง 6 กลุ่ม

Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance Component	Percentage of variation	F_{ST}
Among group	5	128.05	0.51716Va	3.14	0.03142
Within group	112	1785.47	15.9417Vb	96.86	

ความหลากหลายส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นความหลากหลายที่เกิดจากขนาดของอินทรอน ซึ่งอินทรอนที่มีขนาดใหญ่่มากๆ มักจะมีความหลากหลายในระดับต่ำ [20,21]

เครื่องหมาย ILP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ codominant ชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้ครอบคลุมบริเวณที่คาดว่าจะอินทรอน ถึงแม้ว่าข้อมูลขนาดหรือตำแหน่งของเอ็กซอนและอินทรอนในลำดับนั้นยังมีไม่มากนัก แต่การทำนายขนาดและตำแหน่งของเอ็กซอนของพืชชนิดอื่น จากรูปแบบการอนุรักษ์โครงสร้างของบริเวณที่เป็นเอ็กซอนของพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ครอบคลุมอินทรอน ในการศึกษานี้ได้ใช้ลำดับเบสของ EST เทียบกับลำดับเบสจีโนมของมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชต้นแบบในวงศ์ Euphorbiaceae ที่มีความใกล้ชิดกับสบู่ดำ เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในสบู่ดำ มี 84% ของไพรเมอร์ทั้งหมดที่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ ซึ่งถูกนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมาย ILP และเกือบทั้งหมดนี้สามารถถ่ายโอนสู่พืชในจีนัสเดียวกันได้สำเร็จ

จากการวิจัยที่ผ่านมา เครื่องหมาย ILP ส่วนใหญ่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์หรือในระดับที่สูงกว่า [3,4]

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ได้ไม่มากนัก ยกเว้นการศึกษาของ Ming *et al.* (2010) [22] ซึ่งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างของสปีชีส์ย่อยในข้าว โดยเปรียบเทียบระหว่างเครื่องหมาย ILP และ SSR ซึ่งเครื่องหมาย ILP ในการศึกษานี้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดแรกที่ใช้ศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมภายใน สปีชีส์ในสบู่ดำได้เป็นอย่างดี

4.2 โครงสร้างประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ

ความรู้ความเข้าใจทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและการกระจายตัวของความแปรปรวนทั้งภายในและระหว่างตัวอย่างสบู่ดำที่เก็บมาจากบริเวณภูมิภาคที่แตกต่างกันในประเทศไทย และที่นำเข้ามาจากต่างประเทศนั้นมีความสำคัญต่อการเก็บรวบรวมและรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์สบู่ดำ และให้ครอบคลุมความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ เมื่อไม่นานนี้มีรายงานการใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR, AFLP, gSSR และ EST-SSR เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในอินเดียและจีน [7,23,24,25,26] แต่ยังไม่มียางานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสบู่ดำด้วยเครื่องหมาย ILP ซึ่งในการศึกษารุ่นนี้

ใช้เครื่องหมาย ILP ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากร

เมื่อเทียบกับการศึกษาอื่นๆ แล้ว ระดับของความหลากหลายทางพันธุกรรมในสนุ่นดำยังอยู่ในระดับกลาง ($H_i=0.44$) ศูนย์กลางถิ่นกำเนิดของสนุ่นดำนั้นยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด แต่ก็เชื่อกันว่าน่าจะมีแหล่งกำเนิดมาจากเม็กซิโกและอเมริกากลาง และมีรายงานว่าในอินเดียและจีนนั้นมีการนำเข้าสนุ่นดำไม่มากนักจึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งคล้ายกับการแพร่กระจายของสนุ่นดำเข้าสู่ประเทศไทยโดยชาวโปรตุเกสมากกว่าสองศตวรรษก่อน [27] การที่ประเทศไทยมีการนำเข้าพันธุ์สนุ่นดำค่อนข้างน้อยและสนุ่นดำก็เป็นพืชที่มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จึงทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสนุ่นดำในประเทศไทยอยู่ในระดับไม่สูงนัก จากค่า AMOVA แสดงให้เห็นถึงระดับของการเหลื่อมซ้อนกัน และมีกลุ่มประชากรย่อยเล็กๆ ที่ขึ้นกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์นี้สามารถอธิบายได้ว่า แหล่งของความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่พบจากการศึกษานี้ได้จากการตัดส่วนของต้นสนุ่นดำซึ่งคาดว่าจะเป็นตัวแทนพันธุกรรมสนุ่นดำของพื้นที่ปลูกและสถานียทดลองนั้นๆ แต่ไม่มีข้อมูลของแหล่งที่มาของเชื้อพันธุกรรม (germplasm) และขนาดของกลุ่มประชากร ตัวอย่างสนุ่นดำในไทยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจมีการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรม กันอย่างอิสระระหว่างพื้นที่ที่แตกต่างกัน จากการประเมินค่า F_{ST} แบบรายคู่ (ตารางที่ 5) พบว่ากลุ่มประชากรที่มีภูมิประเทศใกล้เคียงกันก็จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันมากกว่า กลุ่มประชากรที่มีภูมิประเทศไกลกว่า ระดับของความแตกต่างทางพันธุกรรมจะลดลงเมื่อการแพร่พันธุ์ของสนุ่นดำส่วนใหญ่เป็นแบบไม่อาศัยเพศ ใน

พื้นที่ใกล้เคียง ถึงแม้ว่าสนุ่นดำจะสามารถให้เมล็ดได้จำนวนมากก็ตาม ซึ่งทำให้มีระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรสูงแต่มีระดับความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากรต่ำ

ผลจาก dendrogram ที่สร้างจากความเหมือนกันทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของสนุ่นดำ 6 กลุ่ม (รูปที่ 2) และโครงสร้างของกลุ่มประชากรแสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างที่มาจากอเมริกาและแอฟริกา มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกลุ่มตัวอย่างในไทยค่อนข้างสูงอันเนื่องมาจากความถี่แอลลีลที่แตกต่างกัน เนื่องจากค่า F_{ST} เป็นค่าเชิงเปรียบเทียบเพื่อประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร ความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรอเมริกาและแอฟริกาที่ต่ำนั้น อาจทำให้การประเมินค่า F_{ST} สูงกว่าที่ควรจะเป็นค่าเซโทโรโซโกซิติที่คาดหมาย (0.39) และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของชานอน (0.51) ของอเมริกาและแอฟริกา (ตารางที่ 4) มีค่าค่อนข้างน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างพันธุ์สนุ่นดำจากอเมริกาและแอฟริกา อาจสามารถที่จะใช้ในการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมในไทยได้แต่อาจไม่มีประสิทธิภาพมากนักแต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาพันธุ์จากเซเนกัล เม็กซิโก และ Namlat พบว่าแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างมากกับสองตัวอย่างจากภาคเหนือของไทย คือ NE-CP ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้สามารถขยายฐานพันธุกรรมของสนุ่นดำในการปรับปรุงพันธุ์ได้

5. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเครื่องหมาย ILP 71 เครื่องหมาย ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสนุ่นดำ ทำให้ได้ข้อมูลของความ

คล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของสมุนไพร โดยระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรที่สูง แต่ความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรที่ค่อนข้างต่ำสะท้อนให้เห็นลักษณะของพืชผสมข้ามอย่างสมุนไพร แต่การแพร่พันธุ์สมุนไพรระหว่างแต่ละพื้นที่ในประเทศนั้น เป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจึงเป็นการเพิ่มการเกิด genetic erosion ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ การสร้างแผนที่จีโนม และใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่ของสมุนไพรที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงที่สุดเพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์สมุนไพรต่อไป

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Choi, H.K., Kim, D., Uhm, T., Limpens, E., Lim, H., Mun, J.H., Kalo, P., Penmetsa, R.V., Seres, A., Kulikova, O., Roe, B.A., Bisseling, T., Kiss, G.B. and Cook, D.R., 2004, A Sequence-based Genetic Map of *Medicago truncatula* and Comparison of Marker Colinearity with *M. sativa*, *Genetics* 166: 1463-1502.
- [2] Feltus, F.A., Singh, H.P., Lohithaswa, H.C., Schulze, S.R., Silva, T.D. and Paterson, A.H., 2006, A Comparative Genomics Strategy for Targeted Discovery of Single-nucleotide Polymorphisms and Conserved-noncoding Sequences in Orphan Crops, *Plant Physiol.* 140: 1183-1191.
- [3] Chen, X., Zhang, G. and Wu, W., 2010, Investigation and Utilization of Intron Length Polymorphisms in Conifers, *New Forests* 41: 379-388.
- [4] Tamura, K.I., Yonemaru, J.I., Hisano, H., Kanamori, H., King, J., King, I., Tase, K., Sanada, Y., Komatsu, T. and Yamada, T., 2009, Development of Intron-flanking EST Markers for the *Lolium festuca* Complex Using Rice Genomic Information. *Theor. Appl. Genet.* 118: 1549-1560.
- [5] Wang, X., Zhao, X., Zhu, J. and Wu, W., 2006, Genome-wide Investigation of Intron Length Polymorphisms and their Potential as Molecular Markers in Rice (*Oryza sativa* L.), *DNA Research* 12: 417-427.
- [6] Wei, H., Fu, Y. and Arora, R., 2005, Intron-flanking EST-PCR Markers: From Genetic Marker Development to Gene Structure Analysis in *Rhododendron*, *Theor. Appl. Genet.* 111: 1347-1356.
- [7] Wen, M., Wang, H., Xia, Z., Zou, M., Lu, C. and Wang, W., 2010, Development of EST-SSR and Genomic-SSR Markers to Assess Genetic Diversity in *Jatropha curcas* L., *BMC Research Notes* 3: 42.
- [8] Gawel, N. and Jarret, R., 1991, A Modified CTAB DNA Extraction Procedure for *Musa* and *Ipomoea*, *Plant Mol. Bio. Rep.* 9: 262-266.
- [9] Yang, L., Jin, G., Zhao, X., Zheng, Y., Xu, Z. and Wu, W., 2007, PIP: A Database of Potential Intron Polymorphism Markers, *Bioinformatics* 23: 2174-2177.

- [10] Brendel, V., Xing, L. and Zhu, W., 2004, Gene Structure Prediction from Consensus Spliced Alignment of Multiple ESTs Matching the same Genomic Locus, *Bioinformatics* 20: 1157-1169.
- [11] Rozen, S. and Skaletsky, H., 2000, Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers, *Methods Mol. Biol.* 132: 365-386.
- [12] Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, T. and Mergeai, G., 2006, Optimization of a Reliable, Fast, Cheap and Sensitive Silver Staining Method to Detect SSR Markers in Polyacrylamide Gels, *Biol. Agron. Soc. Env.* 10: 77-81.
- [13] Liu, K. and Muse, S.V., 2004, PowerMarker: An Integrated Analysis Environment for Genetic Marker Analysis, *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
- [14] Nei, M. and Li, W.H., 1979, Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- [15] Rohlf, F.J., 1998, NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02, Exeter Software, Setauket, New York.
- [16] Yeh, F., Yang, R., Boyle, T., Ye, Z. and Xiyan, J., 2000, PopGene32, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32.
- [17] McDermott, J.M. and McDonald, B.A., 1993, Gene Flow in Plant Pathosystems, *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 353-373.
- [18] Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S., 2005, Arlequin (version 3.0): An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis, *Evol. Bioinf. Online* 1: 47-50.
- [19] Lessa, E.P., 1992, Rapid Surveying of DNA Sequence Variation in Natural Populations, *Mol. Biol. Evol.* 9: 323-330.
- [20] Comeron, J.M. and Kreitman, M., 2000, The Correlation Between Intron Length and Recombination in *Drosophila*: Dynamic Equilibrium between Mutational and Selective Forces, *Genetics* 156: 1175-1190.
- [21] Lynch, M., 2002, Intron Evolution as a Population-genetic Process, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 6118-6123.
- [22] Ming, H., Fang-min, X., Li-yun, C., Xiang-qian, Z., Jojee, L. and Madonna, D., 2010, Comparative Analysis of Genetic Diversity and Structure in Rice Using ILP and SSR Markers, *Rice Sci.* 17: 257-268.
- [23] Basha, S. and Sujatha, M., 2007, Inter and Intra-population Variability of *Jatropha curcas* (L.) Characterized by RAPD and ISSR Markers and Development of Population-specific SCAR Markers, *Euphytica* 156: 375-386.

- [24] Ganesh, R.S., Parthiban, K., Senthil, K.R., Thiruvengadam, V. and Paramathma, M., 2008, Genetic Diversity among *Jatropha* Species as Revealed by RAPD Markers, Gen. Res. Crop Evol. 55: 803-809.
- [25] Sirithunya, P. and Ukoskit, K., 2010, Population Genetic Structure and Genetic Diversity of *Jatropha curcas* Germplasm as Investigated by 5'-anchored Simple Sequence Repeat Primers, J. Plant Sci. Biotech. 13: 147-153.
- [26] Sun, Q., Li, L., Li, Y., Wu, G. and Ge, X., 2008, SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversity in the Biofuel Plant *Jatropha curcas* in China, Crop Sci. 48: 1865-1871.
- [27] Ratee, S., 2004, A Preliminary Study on Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand, Pakistan J. Biol. Sci. 7: 1620-1623.