

# การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR จากอ้อย

## Genetic Diversity of Bamboo in Thailand as Revealed by Sugarcane EST-SSR Markers

อนุชสา บุญชาญ และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ\*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ชัยพิสิทธิ์ พวงจิก

ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

---

### บทคัดย่อ

ไผ่เป็นพืชที่มีการกระจายตัวในหลายภูมิภาคของโลก ในภูมิภาคร้อนชื้นอย่างประเทศไทย สามารถพบไผ่ได้หลายสกุลในประเทศ การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่เป็นส่วนสำคัญในจำแนกและวางแผนการอนุรักษ์พันธุ์ไผ่ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR พัฒนามาจากลำดับเบสที่อนุรักษ์ของยีน สามารถถ่ายโอนข้ามชนิดของพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันได้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR จากอ้อยมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ผลการทดลองพบว่าเครื่องหมาย EST-SSR ของอ้อยจำนวน 53 เครื่องหมาย สามารถใช้ได้กับไผ่ 11 สกุล 32 สปีชีส์ จำนวน 11 เครื่องหมาย มี 8 เครื่องหมายที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic ได้ทั้งหมด 232 แถบ มีค่า Polymorphism Information Content เฉลี่ยเท่ากับ 0.72 แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR ของอ้อยสามารถใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่ได้ดี ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มของตัวอย่างไผ่นั้นพบว่าโดยส่วนใหญ่ไผ่สามารถจัดกลุ่มอยู่ในสกุลเดียวกันและพื้นที่เก็บตัวอย่างใกล้เคียงกัน จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของพันธุกรรมไผ่พบว่าความแปรปรวนของพันธุกรรมไผ่ได้รับอิทธิพลจากความหลากหลายของสปีชีส์ไผ่ที่อยู่ภายในสกุลเดียวกันมากกว่าอิทธิพลจากความแตกต่างของสกุล

คำสำคัญ : ไผ่ ความหลากหลายทางพันธุกรรม อ้อย EST-SSR

## Abstract

Bamboos are widely distributed in the diverse climates around the world, and there are many genera of bamboos in Thailand. Understanding genetic structure and diversity of bamboos is important for identifying and planning for conserving programs. Express sequence tags derived simple sequence repeat (EST-SSR) markers developed from conserved coding sequences show considerable cross-species transferability in related species. In the present study sugarcane EST-SSR markers were selected and used for evaluation of genetic structure and genetic diversity of bamboos collected from different regions within Thailand. Of 53 Sugarcane EST-SSR markers, 11 markers could be transferred into 32 species from 11 genres of bamboos. A total of 232 alleles were detected from eight polymorphic EST-SSR markers. Transferred EST-SSR markers revealed a high average polymorphism information content of 0.72 indicating that the markers was efficiently utilized for phylogenetic and genetic diversity analyses in bamboo. Cluster analysis reflected geographic distance and related species within genus. An analysis of molecular variance indicated that the genetic variation among species within genus contributed mainly to the total genetic variation of bamboo distributed in Thailand.

**Keywords:** genetic diversity, bamboo, EST-SSR, sugarcane

## 1. บทนำ

ไผ่เป็นพืชตระกูลหญ้าที่มีอายุยืนยาวที่สุด บางชนิดมีอายุถึงร้อยปี เป็นพืชที่มีชีพลักษณะแบบ monocarpic เมื่อออกดอกและผลิตเมล็ดแล้วต้นแม่ก็จะตายไป ไผ่มีถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางตามธรรมชาติ ครอบคลุมเกือบทุกส่วนทั่วโลก ทั้งในเขตนานา เขตอบอุ่น และเขตร้อนชื้น ในทวีปยุโรป การกระจายพันธุ์มีมากที่สุด ในเขตร้อนทางตอนใต้และตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชีย คือมีการกระจายพันธุ์ประมาณ 45 สกุล จาก 91 สกุลทั่วโลก จึงนับได้ว่าไผ่นั้นเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดหนึ่ง [1]

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนจึงมีลักษณะภูมิอากาศ และลักษณะภูมิประเทศที่เหมาะสมแก่การกระจายและการเจริญเติบโตของไผ่ ซึ่งถือว่าเป็นศูนย์กลางการกระจายพันธุ์ไผ่แห่งหนึ่งของโลก [2]

เราสามารถพบไผ่ชนิดต่างๆ กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ ด้วยเหตุนี้เองไผ่จึงเป็นพืชที่อยู่คู่กับชีวิตประจำวันของคนไทยมาตั้งแต่สมัยโบราณ คนไทยเรารู้จักการใช้ประโยชน์จากไผ่ โดยการนำมาสนองต่อความต้องการพื้นฐานในด้านต่างๆ เช่น นำหน่อไผ่มาใช้เป็นอาหาร นำเส้นใยที่ได้จากการตีเยื่อไผ่มาทำเครื่องนุ่งห่ม นำลำไผ่มาทำเป็นที่อยู่อาศัย นำมาสร้างเป็นของประดับตกแต่งบ้าน หรือนำมาทำเป็นของใช้ในครัวเรือน ในปัจจุบันนี้ไผ่ได้กลายเป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของไทย เนื่องจากมีการทำอุตสาหกรรมเกี่ยวกับการแปรรูปและส่งออกไผ่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์จากไผ่และหน่อไผ่ยังคงทำรายได้ให้ประเทศเพิ่มมากขึ้นด้วย

ในประเทศไทยนั้นสามารถพบไผ่ประมาณ 15 สกุล [2] ซึ่งคาดว่าอาจมีบางชนิดที่ยังสำรวจไม่พบ เนื่องจากอาจอยู่ในป่าลึก และขาดผู้เชี่ยวชาญในการ

จำแนกพันธุ์ อุปสรรคที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการจำแนกพันธุ์ไฟคือ การที่ไฟมีอายุขัยในการออกดอกและผลิตเมล็ดยาวนานและไม่สม่ำเสมอ ไฟแต่ละชนิดจะออกดอกและผลิตเมล็ดในอายุที่ต่างกัน ทำให้เกิดความลำบากในการเก็บตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ ด้วยเหตุผลข้างต้นทำให้มีการประยุกต์ใช้ความรู้เรื่องเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของไฟ ทำให้สามารถจำแนกพันธุ์ไฟได้ง่ายขึ้นและความแม่นยำมากขึ้น

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR (express sequence tag - simple sequence repeat) เป็นเครื่องหมายที่ได้รับความนิยมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งในพืชและสัตว์ เนื่องจากสามารถพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว จากการค้นหา SSR ในฐานข้อมูล EST ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนาน้อย เป็นเครื่องหมายที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม และเนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่พัฒนาจากส่วนที่เป็นอินตรอนจึงมีลำดับเบสอนุรักษ์ ทำให้สามารถใช้ประโยชน์ข้ามสปีชีส์หรือสกุลได้ดี [3,4] ในการวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไฟที่สำรวจในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จากอ้อยซึ่งเป็นพืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไฟ

## 2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 2.1 พืชที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างไฟทั้งหมด 11 สกุล 32 สปีชีส์ (ตารางที่ 1) จำนวน 49 ตัวอย่าง เป็นตัวแทนของไฟที่เก็บรวบรวมได้ในประเทศไทย จากตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมด 136 ตัวอย่าง จากภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย

ธรรมศาสตร์ ธรรมชาติพันธุ์ และคุณศิริภาพอาจารย์เจ้าของสวนไฟนานาพันธุ์ โดยกำหนดให้ไฟแต่ละสกุลเป็นตัวแทนกลุ่มประชากรพื้นฐาน

### 2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนสดของตัวอย่างไฟแต่ละตัวอย่างมาบดในไนโตรเจนเหลว เพื่อให้เซลล์แตกออก และสกัด Genomics DNA ออกมาจากเซลล์โดยวิธีของ Gawel และ Jarnet (1991) [5]

### 2.3 การคัดเลือกเครื่องหมาย EST-SSR

คัดเลือกจากเครื่องหมาย EST-SSR ของอ้อย จำนวนทั้งหมด 58 เครื่องหมาย [5] มีหน้าที่อยู่ใน 4 กลุ่ม คือ sugarcane metabolism, disease response, abiotic stress response และ growth regulator เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR กับตัวอย่างในเบื่องต้นจากทุกสกุล สกุลละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ส่วนประกอบ PCR ปริมาตรรวม 20  $\mu$ l ประกอบด้วย DNA template 20 ng, PCR buffer, dNTPs 4  $\mu$ M,  $MgCl_2$  10  $\mu$ M, forward primer 10 pmol., reverse primer 10 pmol., *Taq* DNA polymerase 5U และอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ denature ที่ 94°C นาน 5 นาที และต่อด้วย 35 รอบ อุณหภูมิที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบด้วย 94°C นาน 1 นาที annealing สำหรับแต่ละเครื่องหมาย นาน 1 นาที extension 72°C นาน 2 นาที และ final extension 72°C นาน 7 นาที วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เครื่องหมายที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ทั้ง 11 สกุล ถูกนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างไฟทั้งหมด นำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์ด้วย 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรท แล้วนับจำนวนแถบดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ในการวิเคราะห์

ตารางที่ 1 ตัวอย่างที่ให้นำมาศึกษาจำนวนทั้งหมด 49 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 11 สกุล 32 ชนิด

| ชื่อวิทยาศาสตร์                      | ชื่อภาษาไทย          | ที่มา                | ชื่อวิทยาศาสตร์                       | ชื่อภาษาไทย            | ที่มา              | ชื่อวิทยาศาสตร์                         | ชื่อภาษาไทย      | ที่มา               |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------------------|------------------|---------------------|
| <i>Phyllostachys</i> sp.             | ไผ่ลาย               | สุพรรณบุรี           | <i>Dendrocalamus hamiltonii</i>       | ไผ่หก (เขาค้อ)         | เพชรบูรณ์          | <i>Bambusa</i> sp.                      | ไผ่บงหวาน        | ด่านช้างสุพรรณบุรี  |
| <i>Phyllostachys nigra</i>           | ไผ่ดำ                | ลพบุรี               | <i>Dendrocalamus hamiltonii</i>       | ไผ่หก                  | ลำพูน              | <i>Bambusa glaucophylla</i> Widajaja    | ไผ่เงิน          | ประจิมบุรี          |
| <i>Phyllostachys makinoi</i>         | ไผ่ปากหินน้อย        | ประจิมบุรี           | <i>Dendrocalamus strictus</i> (Roxb.) | ไผ่รางค้อย             | ปากช่องนครราชสีมา  | <i>Thyrsostachys siamensis</i>          | ไผ่รวก (ไผ่ไรโต) | "ไพร ไผ่รางค้อยบุรี |
| <i>Dendrocalamus membranaceus</i>    | ไผ่ชงมวลด            | "ไพร ไผ่รางค้อยบุรี  | <i>Dendrocalamus latiflorus</i> Munro | ไผ่รางค้อย             | ลำพูน              | <i>Thyrsostachys siamensis</i>          | ไผ่รวก3          | "ไพร ไผ่รางค้อยบุรี |
| <i>Dendrocalamus membranaceus</i>    | ไผ่ชงมวลดเมล็ด       | "ไพร ไผ่รางค้อยบุรี  | <i>Dendrocalamus copelandii</i>       | ไผ่มันหนู              | ลำพูน              | <i>Thyrsostachys siamensis</i>          | ไผ่รวก2          | เพชรบูรณ์           |
| <i>Dendrocalamus membranaceus</i>    | ไผ่ชงมวลด            | สวนวชิรวันพุทธมณฑล   | <i>Dendrocalamus becheviana</i>       | ไผ่กินซุง (หน่อทอง)    | กาญจนบุรี          | <i>Thyrsostachys oliveri</i>            | ไผ่รวกดำ         | นครปฐม              |
| <i>Dendrocalamus membranaceus</i>    | ไผ่ชงมวลด            | "ไร่BN เพชรบูรณ์     | <i>Bambusa multiplex</i>              | ไผ่เลี้ยงหวาน (หนองอู) | มหาสารคาม          | <i>Gigantochloa hirscentii</i>          | ไผ่บงคาย         | ประจิมบุรี          |
| <i>Dendrocalamus auriculata</i> Kurz | ไผ่มัน               | สวนวชิรวันพุทธมณฑล   | <i>Bambusa multiplex</i>              | ไผ่เลี้ยงหวาน (หนองอู) | มหาสารคาม          | <i>Gigantochloa ligulata</i> Gamble     | ไผ่เนาะ          | ประจิมบุรี          |
| <i>Dendrocalamus auriculata</i> Kurz | ไผ่มัน               | ประจิมบุรี           | <i>Bambusa multiplex</i>              | ไผ่เลี้ยงหวาน          | บึงสามพันเพชรบูรณ์ | <i>Vietnamosasa ciliata</i> (A. Camus)  | ไผ่จืด           | เพชรบูรณ์           |
| <i>Dendrocalamus auriculata</i> Kurz | ไผ่ปะ                | "ไร่BN เพชรบูรณ์     | <i>Bambusa tulda</i>                  | ไผ่ต่งดำ               | มหาสารคาม          | <i>Vietnamosasa pusilla</i>             | ไผ่ตัก           | ลพบุรี              |
| <i>Dendrocalamus asper</i> Backer    | ไผ่ต่ง               | ประจิมบุรี           | <i>Bambusa tulda</i>                  | ไผ่ต่งช้าง             | ทองผาภูมิกาญจนบุรี | <i>Cephalostachyum virgatum</i>         | ไผ่ต๊ะ           | ประจิมบุรี          |
| <i>Dendrocalamus asper</i> Backer    | ไผ่ต่ง               | ประจิมบุรี           | <i>Bambusa oldhamii</i>               | ไผ่ต่ง (ลู่)           | มก.กาญจนบุรี       | <i>Cephalostachyum pergracile</i>       | ไผ่ข้าวหลาม      | มก.กาญจนบุรี        |
| <i>Dendrocalamus asper</i>           | ไผ่ต่งเขียวศรีประจิม | ประจิมบุรี           | <i>Bambusa longispiculata</i>         | ไผ่สามะลอก             | ประจิมบุรี         | <i>Melocanna humilis</i> Kurz           | ไผ่กรือท         | ประจิมบุรี          |
| <i>Dendrocalamus sericens</i>        | ไผ่ชงมวลด            | ดอยเชียงดาวเชียงใหม่ | <i>Bambusa blumeana</i>               | ไผ่สีสุก               | ประจิมบุรี         | <i>Neohouzeana mekongensis</i>          | ไผ่หลอด          | ประจิมบุรี          |
| <i>Dendrocalamus sericens</i>        | ไผ่ชงมวลดเมล็ด       | นครนายก              | <i>Bambusa vulgaris</i>               | ไผ่ต่ง                 | ประจิมบุรี         | <i>Schizostachyum brachycladum</i> Kurz | ไผ่สีทอง         | ประจิมบุรี          |
| <i>Dendrocalamus brandisii</i> Kurz  | ไผ่บงใหญ่            | ทองผาภูมิกาญจนบุรี   | <i>Bambusa ventricosa</i>             | ไผ่บงใหญ่              | ราชบุรี            | <i>Dinocloa scandens</i> (Blume) Kunze  | ไผ่เลื้อย        | "ไร่BN เพชรบูรณ์    |
| <i>Dendrocalamus brandisii</i> Kurz  | ไผ่บงใหญ่            | ประจิมบุรี           |                                       |                        |                    |                                         |                  |                     |

## 2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บข้อมูลแถบดีเอ็นเอแบบการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (แบบข่มสมบูรณ์) ข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR ของอ้อยทั้งหมด 11 เครื่องหมาย จะถูกนำมาวิเคราะห์ polymorphism information content (PIC) [7] genetic similarity coefficient จากนั้นนำข้อมูล ค่า coefficient ไปวิเคราะห์การจับกลุ่มและนำมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.01 [8] วิเคราะห์ Shannon's Information index จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic โดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 [9] และวิเคราะห์ analysis of molecular variance (AMOVA) ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN 3.1 [10]

## 3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 3.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย EST-SSR

จากเครื่องหมายทั้งหมด 58 เครื่องหมาย เลือกมาจากขึ้น 4 กลุ่ม คือ sugarcane metabolism, disease response, abiotic stress response และ growth regulator สามารถคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ได้กับตัวอย่างไผ่ทั้งหมด 11 สกุล 32 สปีชีส์ มีจำนวน 11 เครื่องหมาย (ตารางที่ 2) โดยคิดเป็นอัตราการถ่ายโอนเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR จากอ้อย เข้าสู่ไผ่เท่ากับ 18.97% ซึ่งอัตราการถ่ายโอนนี้มีค่าน้อยกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sharma *et al.* (2008) [11] ที่ใช้เครื่องหมาย EST-SSR จากอ้อย ศึกษาไผ่จำนวน 23 สปีชีส์ มีอัตราการถ่ายโอนเท่ากับ 75% ทั้งนี้เนื่องในการทดลองนี้ไผ่ที่นำมาศึกษามีความหลากหลาย

ของจำนวนสกุลและจำนวนสปีชีส์มากกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยดังกล่าว ดังนั้นจำนวนของเครื่องหมายที่สามารถเพิ่มปริมาณแบบจำเพาะในทุกสปีชีส์ของไผ่จึงมีจำนวนน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย EST-SSR ของอ้อยที่ได้พัฒนาไว้แล้วก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน เช่น ในไผ่ซึ่งเป็นพืชตระกูลหญ้าเหมือนกัน โดยไม่ต้องมีค่าใช้จ่ายในการพัฒนา SSR เพิ่มเติมอย่างใด

### 3.2 การประเมินเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR

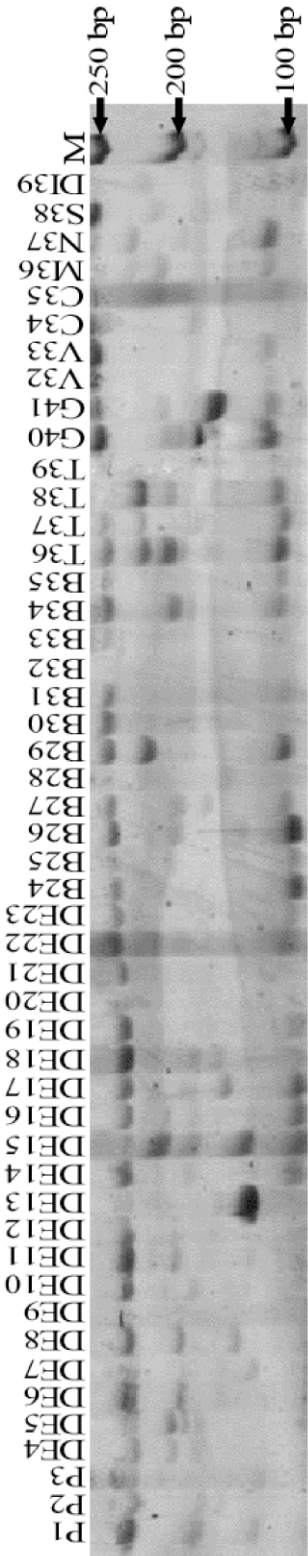
จากเครื่องหมายที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 11 เครื่องหมายนั้นพบว่ามี 8 เครื่องหมาย ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic คือเครื่องหมาย SEM425, SEM430, SEM432, SEM435, SEM436, SEM447, SEM451 และ SEM455 ส่วนเครื่องหมายที่เหลือคือ SEM426, SEM431 และ SEM454 ไม่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างไผ่ที่นำมาศึกษา ตัวอย่างลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic แสดงในรูปที่ 1

จากตัวอย่างภาพพบว่าการเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งแบบที่เป็นแถบเดี่ยวต่อตัวอย่าง สองแถบต่อตัวอย่าง และมี 4 ตัวอย่าง ที่เกิดแถบดีเอ็นเอมากกว่าสองแถบ ได้แก่ DE15 ไผ่ชางหม่น (*Dendrocalamus sericeus*) B29 ไผ่หยก (*Bambusa oldhamii*) T36 ไผ่รวก (ไทรโยค 1) (*Thyrsostachys siamensis*) และ T38 ไผ่รวก 2 (*Thyrsostachys siamensis*) ลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบมากกว่าสองแถบเป็นไปได้ว่าตัวอย่างไผ่เหล่านี้อาจเป็นไผ่ที่เป็นพืชพวก polyploid หรืออาจเกิดจากการ duplication ของยีนที่ใช้ศึกษา ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sharma *et al.* (2008) [11] ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด

ตารางที่ 2 ตารางแสดงรายละเอียดเครื่องหมายที่คัดเลือกได้

| Marker  | Motif  | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (3'-5') | Expected EST homology                                                | E-value  | PIC    |
|---------|--------|------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------|--------|
| SEM 425 | (gcc)5 | GTGCCACCGAGCAAT        | TCTCTAGTGCTCGACTTC     | Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplast precursor (FBPase)          | 2.00E-26 | 0.3642 |
| SEM 426 | (at)5  | TCGAGAGCGGTTTCATCTTT   | CTTTCCTGTAGCCAAAGTGA   | Sugar transporter family protein                                     | 1.00E-14 | .*     |
| SEM 430 | (cgg)5 | TCCGACTACCTCAAGTGCAAG  | GACGGCATCTTCTTCTCTCC   | sucrose synthase                                                     | 7.00E-40 | 0.4288 |
| SEM 431 | (ca)6  | CAATTCTCGATCCAAAGAAGGT | CCATGACTCCCAATTGAAGG   | alpha-amylase                                                        | 7.00E-86 | .*     |
| SEM 432 | (gc)6  | CGGTCCTAGATTAGTAGCTC   | AGCGAGTAGATGTTGATGACCC | Sugar transporter family protein                                     | 3.00E-70 | 0.9306 |
| SEM 435 | (ga)5  | AGGCTGAGAGAGCAAGAAAGA  | CCTAGGATCCTTCGGGTTTC   | stress-induced protein sti1                                          | 1.00E-31 | 0.9157 |
| SEM 436 | (tcc)5 | GGTCCCATACATAACACAAGCA | TGCATGAAGAAGCTCAGGTG   | disease resistance response protein-related/irrigent protein-related | 6.00E-45 | 0.6432 |
| SEM 447 | (gc)5  | TGAGTTCAGTTCCTTCCCC    | AGAACTCCAAGGAGCAGCAG   | low temperature and salt responsive protein-like                     | 4.00E-12 | 0.9622 |
| SEM 451 | (cga)6 | TAGTACCGGACAGACCTTTCT  | GACTGAAACGCAAGAGAGCAG  | cold induced protein-like                                            | 3.00E-22 | 0.9218 |
| SEM 454 | (gga)6 | GTAAGTACGAGCAACCCTAGCC | ATCCTCTTTTGCCTCCCT     | water-stress protein-like protein                                    | 4.00E-16 | .*     |
| SEM 455 | (gca)5 | CCAAAGCTACCGACATCTG    | AGGACGGGTACTTGTGAGGT   | dehydration-responsive element binding protein 3                     | 2.00E-37 | 0.6267 |
| Mean    |        |                        |                        |                                                                      |          | 0.7242 |

\*= เครื่องหมายที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบ Monomorphic



รูปที่ 1 การเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic ของเครื่องหมาย SEM 455 โดยแถวขวามือสุด M คือ Marker Hind/IV และแถวที่ 1 – 49 เป็นตัวอย่างได้ทั้งหมด 49 ตัวอย่าง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

EST-SSR ของอ้อย Yu *et al.* (2004) [12] ที่ศึกษาเครื่องหมาย EST-SSR ของข้าวสาลี และ Saha *et al.* (2004) [13] ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR ของหญ้า *Festuca arundinacea* ที่เป็นพืชในวงศ์เดียวกันแล้วพบลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการ duplication ของยีนที่ใช้ศึกษา และการเกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็นพืช polyploidy เครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 8 เครื่องหมาย ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic สามารถสร้างจำนวนแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 232 แถบ เมื่อนำมาศึกษาในตัวอย่างไฟทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อไพรเมอร์เท่ากับ

29 แถบ (แอลลิล) (ตารางที่ 3) พบว่าค่า PIC ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมาย แต่ละเครื่องหมายมีค่า PIC อยู่ในช่วง 0.3642-0.9622 โดยเครื่องหมายที่มีค่า PIC ต่ำสุดคือ SEM425 มีค่า PIC เท่ากับ 0.3642 ส่วนเครื่องหมายที่มีค่า PIC สูงที่สุดคือ SEM447 มีค่า PIC เท่ากับ 0.9622 เครื่องหมายทั้งหมดมีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.7242 แสดงว่าเครื่องหมาย EST-SSR จากอ้อยสามารถใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไฟได้ดีเนื่องจากค่า PIC ที่ได้นั้นมีค่าสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sharma *et al.* (2008) [11]

ตารางที่ 3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไฟจำแนกตามสกุลไฟทั้งหมด 11 สกุล

| Genus                       | จำนวน<br>ตัวอย่าง | Shannon's<br>Information index | จำนวนแถบดีเอ็นเอ<br>แบบ Polymorphic |
|-----------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Phyllostachys</i> spp.   | 3                 | 0.13                           | 22                                  |
| <i>Dendrocalamus</i> spp.   | 20                | 0.29                           | 92                                  |
| <i>Bambusa</i> spp.         | 12                | 0.23                           | 64                                  |
| <i>Thyrsostachys</i> spp.   | 4                 | 0.14                           | 29                                  |
| <i>Gigantochloa</i> spp.    | 2                 | 0.08                           | 13                                  |
| <i>Vietnamosasa</i> spp.    | 2                 | 0.12                           | 20                                  |
| <i>Cephalostachyum</i> spp. | 2                 | 0.16                           | 27                                  |
| <i>Melocanna</i> spp.       | 1                 | 0.00                           | 0                                   |
| <i>Neohouzeana</i> spp.     | 1                 | 0.00                           | 0                                   |
| <i>Schizostachyum</i> spp.  | 1                 | 0.00                           | 0                                   |
| <i>Dinorchloa</i> spp.      | 1                 | 0.00                           | 0                                   |

### 3.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไฟ

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มตัวอย่างไฟสปีชีส์ต่างๆ ด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ (รูปที่ 2) โดยในแต่ละกลุ่มมีค่า

สัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงค่อนข้างสูง อยู่ระหว่าง 0.83-0.91 ทั้งนี้เนื่องจากโดยธรรมชาติส่วนใหญ่การขยายพันธุ์ของไฟเป็นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ ซึ่งเป็นการคงจีโนไทป์เดิมของไฟไว้ จึงทำให้ มีความคล้ายคลึงกันของจีโนไทป์ภายในสปีชีส์เดียวกันสูง

โดยเฉพาะตัวอย่างไผ่ที่เก็บในพื้นที่บริเวณใกล้เคียงกัน

กลุ่มแรก (I) ของตัวอย่างไผ่ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกลุ่มตัวอย่างในสกุล *Phyllostachys* spp. การจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sharma *et al.* (2008) [11] ที่มีการจัดกลุ่มตัวอย่างในสกุล *Phyllostachys* spp. แยกออกจากสกุลอื่นๆ ได้ชัดเจน ส่วนกลุ่มที่สอง (II) จะประกอบด้วยตัวอย่างในสกุล *Bambusa* spp. สกุล *Cephalostachyum* spp. สกุล *Dendrocalamus* spp. สกุล *Dinochloa* spp. สกุล *Gigantochloa* spp. สกุล *Neohouzeana* spp. สกุล *Schizostachyum* spp. สกุล *Thysostachys* spp. สกุล *Vietnamosasa* spp. และไผ่เกรียบ (*Melocanna humillis* Kurz) โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มย่อย a ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสกุล *Dendrocalamus* spp. และกลุ่มย่อย b ที่ประกอบด้วยสกุล *Bambusa* spp. สกุล *Cephalostachyum* spp. สกุล *Dinochloa* spp. สกุล *Gigantochloa* spp. สกุล *Neohouzeana* spp. สกุล *Schizostachyum* spp. สกุล *Thysostachys* spp. สกุล *Vietnamosasa* spp. และไผ่เกรียบ (*Melocanna humillis* Kurz) การจัดแบ่งกลุ่มย่อยนี้มีความสอดคล้องกับลักษณะการออกดอกและการกระจายพันธุ์ที่แตกต่างกันของไผ่ และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Watanabe *et al.* (1994) [14] ที่พบว่าไผ่สกุล *Gigantochloa* spp. มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไผ่สกุล *Bambusa* spp. นอกจากนั้นยังพบว่ามีบางตัวอย่างในสกุล *Dendrocalamus* spp. มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไผ่ในสกุล *Bambusa* spp. มากกว่าไผ่สปีชีส์อื่นๆ ในสกุลเดียวกันสอดคล้องกับการศึกษาของ Li (1997) [15] ที่พบไผ่บางสปีชีส์ถูกจัดกลุ่มให้อยู่กลุ่มเดียวกันกับไผ่ในสกุล *Bambusa* spp. กลุ่มที่สามมีเพียงสกุล

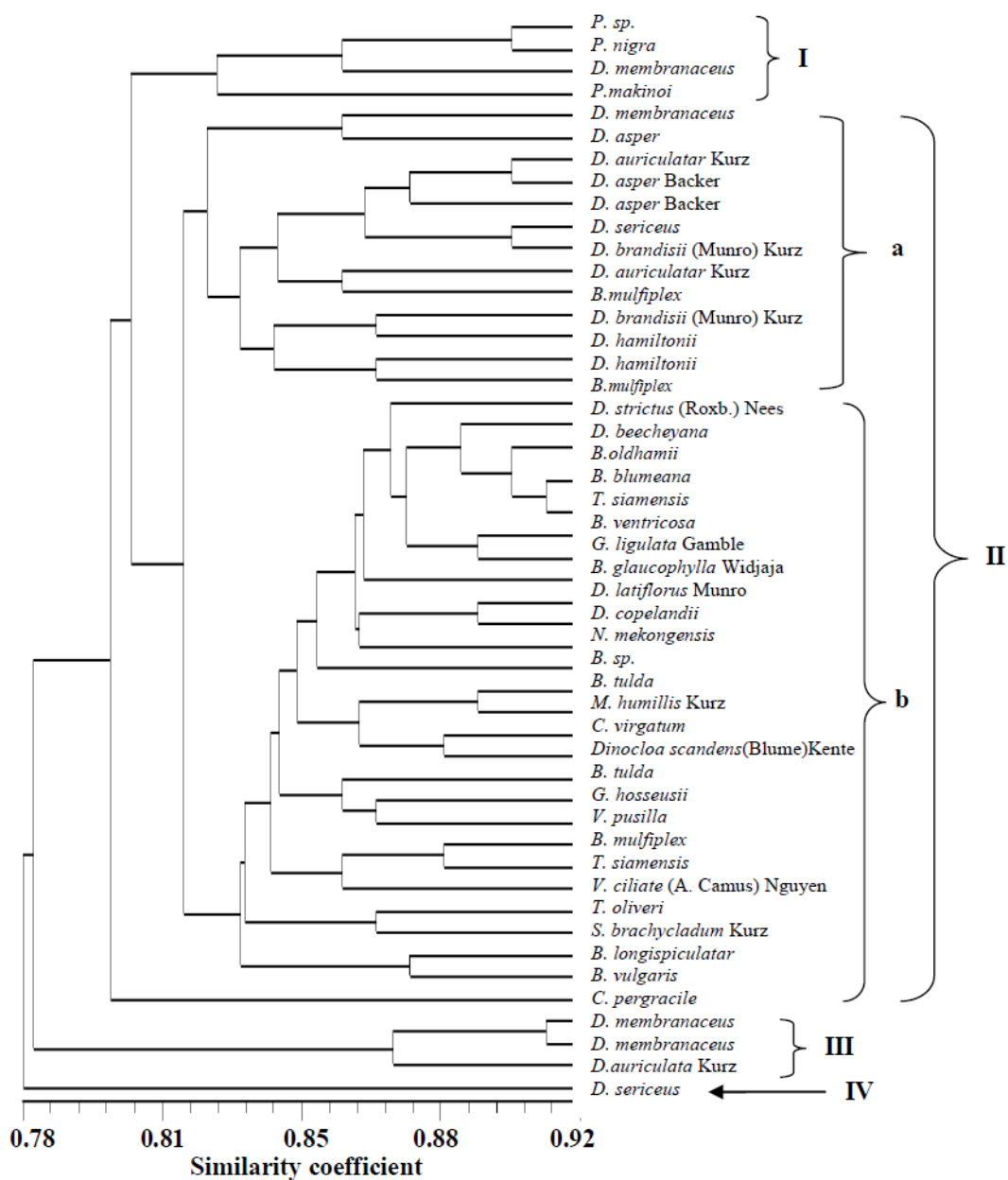
เดียวคือ *Cephalostachyum pergracile* ส่วนกลุ่มที่สี่ (IV) นั้นประกอบด้วย 3 ตัวอย่าง คือ DE5 ไผ่ขางนวล (*Dendrocalamus membranaceus*) DE6 ไผ่ขางนวล (*Dendrocalamus membranaceus*) และ DE8 ไผ่มั่น (*Dendrocalamus auriculata* Kurz) และกลุ่มที่ห้า (IV) คือตัวอย่าง DE15 ไผ่ขางหม่น (*Dendrocalamus sericeus*) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ปลูกจากเมล็ด การที่ไผ่ตัวอย่างนี้ถูกแยกออกมาจากไผ่ชนิดอื่นๆ ในสกุลเดียวกันอาจเนื่องมาจากไผ่ตัวอย่างนี้ได้รับการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดซึ่งมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงกว่าการปลูกโดยไม่อาศัยเพศ จึงทำให้เกิดความแตกต่างจากไผ่ตัวอย่างอื่นๆ มากที่สุด

เป็นที่น่าสังเกตว่า *Dendrocalamus* spp. สปีชีส์ต่างๆ เป็นสมาชิกในกลุ่มต่างๆ ทั้งสี่กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wong (1995) [16] แสดงให้เห็นว่าไผ่ *Dendrocalamus* spp. มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของสปีชีส์กว้างมาก โดยสปีชีส์ส่วนใหญ่จะมีความคล้ายคลึงกับไผ่ *Bambusa* spp. (รูปที่ 2)

### 3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของไผ่แต่ละสกุล

การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของไผ่แต่ละสกุลโดยการแบ่งกลุ่มประชากรไผ่ออกเป็น 11 กลุ่ม ตามไผ่ทั้งหมด 11 สกุล ค่า Shannon's information index (I) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในแต่ละสกุลสกุลที่มีค่า I สูงสุด คือ สกุล *Dendrocalamus* spp. มีค่า I เท่ากับ 0.29 ส่วนสกุลที่มีค่า I เท่ากับ 0 มี 4 สกุล คือ *Melocanna* spp., *Neohouzeana* spp., *Schizostachyum* spp. และ *Dinochloa* spp. เนื่องจากจำนวนตัวอย่างของทั้ง 4 สกุล นั้นมีสกุลละ 1 ตัวอย่าง





รูปที่ 2 Phylogram แสดงการจัดกลุ่มของตัวอย่างไม้

เท่านั้น ค่า I นี้ สอดคล้องกับจำนวนแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic และสัดส่วนการเกิดแถบดีเอ็นเอ

สัดส่วนการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic โดยสกุล *Dendrocalamus* spp. นั้นมีจำนวนการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic สูงสุด

คือ 92 แถบ คิดเป็นสัดส่วนการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic สูงสุด 77.97% เนื่องจากสกุล *Dendrocalamus* spp. ที่ศึกษาในการทดลองครั้งนี้มีจำนวนตัวอย่างและจำนวนสปีชีส์มากที่สุดเมื่อเทียบกับไฟสกุลอื่นที่นำมาศึกษา สกุล *Bambusa* spp. มี

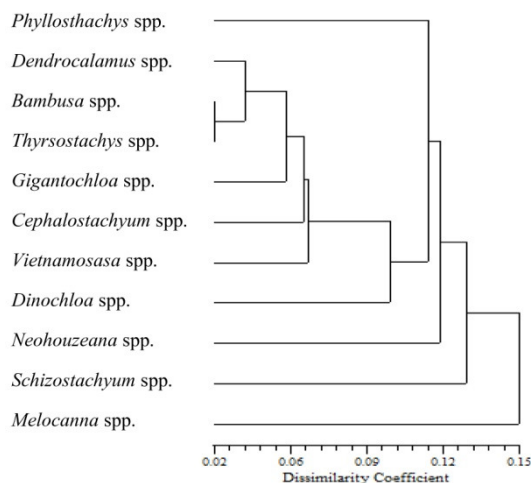
จำนวนการเกิดแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic รองลงมาเท่ากับ 64 มีค่า I เท่ากับ 0.23

ค่า I ของไฟแต่ละสกุลนอกจากจะสัมพันธ์กับจำนวนตัวอย่างแล้ว ยังสัมพันธ์กับความหลากหลายของพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างและความหลากหลายของพื้นที่ที่เก็บจะพบว่าไฟสกุล *Dendrocalamus* spp. มีความหลากหลายสูงสุดเนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษา 20 ตัวอย่าง เก็บมาจาก 9 จังหวัดใน 5 ภูมิภาคของประเทศไทย ในกรณีไฟสกุล *Phyllostachys* spp., *Thyrsostachys* spp., *Gigantochloa* spp., *Vietnamosasa* spp. และ *Cephalostachyum* spp. แม้ว่าจำนวนตัวอย่างใกล้เคียงกัน คือ 3, 4, 2, 2 และ 2 ตามลำดับ สกุล *Cephalostachyum* spp. และ *Thyrsostachys* spp. มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.16 และ 0.14 ทั้งนี้เนื่องจากไฟในสกุล *Cephalostachyum* spp. เก็บมาจากจังหวัดที่มีตำแหน่งที่ค่อนข้างห่างกัน ดังนั้นในการวางแผนการเก็บตัวอย่างไฟที่จะใช้ในการอนุรักษ์นั้นจึงควรพิจารณาถึงทั้งจำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างไฟเพื่อให้ครอบคลุมความหลากหลายทางพันธุกรรมของไฟ จาก phylogram (รูปที่ 3) แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของแต่ละสกุลไฟ พบว่าไฟสกุล *Bambusa* spp. และไฟสกุล *Thyrsostachys* spp. มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด โดยมีค่า dissimilarity coefficient เท่ากับ 0.02 ผลที่ได้นี้ต่างจากการศึกษาของ Jin *et al.* (2000) [17] ที่พบว่าไฟสกุล *Bambusa* spp. และไฟสกุล *Thyrsostachys* spp. ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมต่ำ โดยมีค่า dissimilarity coefficient ประมาณ 0.70 ไฟที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ กลุ่มตัวอย่างสกุล *Shizostachyum* spp. และกลุ่มตัวอย่างสกุล *Melocanna* spp. ซึ่งมีค่า dissimilarity

coefficient ประมาณ 0.13 ลักษณะการจัดกลุ่มตัวอย่างของ Phylogram นี้ใกล้เคียงกับจัดแบ่งกลุ่มตัวอย่างไฟทั้ง 32 สปีชีส์ในรูปที่ 2 โดยจัดกลุ่มให้สกุล *Phyllostachys* spp. แยกออกจากสกุลอื่นเป็นกลุ่มหนึ่งเฉพาะสกุล และจัดรวมไฟสกุล *Bambusa* spp. สกุล *Cephalostachyum* spp. สกุล *Dendrocalamus* spp. สกุล *Dinochloa* spp. สกุล *Gigantochloa* spp. สกุล *Thyrsostachys* spp. และสกุล *Vietnamosasa* spp. รวมอยู่ในกลุ่มใหญ่กลุ่มเดียวกัน การจัดกลุ่มไฟสกุล *Thyrsostachys* spp. รวมกับไฟสกุล *Bambusa* spp. และไฟสกุล *Gigantochloa* spp. นี้คล้ายกับการศึกษาของ Watanabe *et al.* (1994) [14] และ Jin *et al.* (2000) [17] ที่ศึกษาพบว่าไฟสกุล *Thyrsostachys* spp. นี้อยู่ใน Subtribe Bambusinae เช่นเดียวกับไฟสกุล *Bambusa* spp. และไฟสกุล *Gigantochloa* spp. ไฟสกุล *Melocanna* spp. ถูกแยกออกจากไฟสกุลอื่นอย่างชัดเจน เนื่องจากไฟสกุลนี้มีค่า dissimilarity coefficient มากที่สุด ซึ่งการจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับการจัดจำแนกไฟตามอนุกรมวิธาน (Ohnberger, 1999) [17] ที่ศึกษาพบว่าเมื่อจัดจำแนกไฟออกเป็นกลุ่มตามสกุล ไฟสกุล *Melocanna* spp. จะถูกจัดกลุ่มแยกไปรวมกลุ่มอยู่กับไฟในสกุล *Ochlandra* spp. ซึ่งเป็นคนละกลุ่มกับไฟที่ศึกษาในการทดลองนี้

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธี AMOVA พบว่าค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของไฟหลายสปีชีส์ที่อยู่ภายในสกุลเดียวกันมีค่า 90% (ตารางที่ 4) ของความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งหมด ขณะที่ความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างสกุลคิดเป็นสัดส่วน 10% ของความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของไฟในประเทศส่วนใหญ่ เป็นผลจากความหลากหลายทางพันธุกรรม

ของสปีชีส์ ดังนั้นในการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้เพื่อ  
ดำรงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้จึงควรให้  
ความสำคัญกับการเก็บรวบรวมไม้หลายๆ สปีชีส์



รูปที่ 3 Phylogram แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของ  
ไม้ 11 สกุล

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ AMOVA

| Source of variation | d.f. | Sum of square | Variance components | Percentage of variation |
|---------------------|------|---------------|---------------------|-------------------------|
| Among Genus         | 10   | 139.589       | 1.0986              | 10                      |
| Within Genus        | 38   | 375.717       | 9.8873              | 90                      |
| Total               | 48   | 515.306       | 10.9859             |                         |

Fixation Index FST: 0.1000

#### 4. สรุป

เครื่องหมาย EST-SSR จากอ้อยซึ่งเป็นพืชที่มี  
วิวัฒนาการใกล้เคียงกับไม้ สามารถนำมาใช้  
ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้  
ได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย  
ในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR แต่อย่างใด เครื่องหมาย  
EST-SSR จากอ้อยที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้มี  
ความสามารถในการถ่ายทอดโอนมาใช้กับไม้ต่าง

สกุลได้เป็นจำนวนไม่มากนัก เนื่องจากความ  
หลากหลายของสกุลและสปีชีส์ไม้ของการทดลองนี้มี  
จำนวนมาก ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้  
ในแต่ละสกุลมีความสัมพันธ์กับจำนวนตัวอย่างที่เก็บ  
และความหลากหลายของพื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งเป็น  
ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ใน  
ประเทศไทยให้ดำรงความหลากหลายทางพันธุกรรม  
โดยอนุรักษ์พันธุกรรมของไม้สปีชีส์ต่างๆ ที่อยู่  
ภายในแต่ละสกุล

#### 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และ  
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

#### 6. เอกสารอ้างอิง

- [1] อนันต์ อนันตโชติ, 2534, ไม้ไผ่ประเทศไทยที่  
น่ารู้จัก, ภาควิชาการจัดการป่าไม้ คณะวน  
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [2] รุ่งนภา พัฒนวิบูลย์, บุญฤทธิ์ ภูริยากร และวลัย  
พร สถิตวิบูลย์, 2544, ไม้ไผ่ในประเทศไทย,  
กรุงเทพฯ.
- [3] Kantety, R., Rotal, M., Matthews, D. and  
Sorrells, M., 2002, Data Mining for Simple  
Sequence Repeats in Expressed Sequence Tags  
from Barley, Maize, Rice, Sorghum and  
Wheat, Plant Mol. Biol. 48: 501-510.
- [4] Varshney, R., Thiel, T., Stein, N., Langridge,  
P. and Graner, A., 2002, *In Silico* Analysis on  
Frequency and Distribution of Microsatellites  
in ESTs of Some Cereal Species, Cell Mol.  
Biol. Lett. 7: 537-546.

- [5] Gawel, N. L. and Jaret, R.L., 1991, A Modified CTAB DNA Extraction Procedure of *Musa* and *Ipomoea*, Plant Mol. Bio. Rep. 9: 262-266.
- [6] Thipmongkolcharoen, P., Poomipan, P. and Ukoskit, K., 2007, Development of EST-SSR Markers by Data Mining from Sugarcane ESTs, Abstracts of the 6th Asian crop science Association Conference, Bangkok, p. 55.
- [7] Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980, Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms, Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.
- [8] Rohlf, F. J., 1998, NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02, Exeter Software, Setauket, New York.
- [9] Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T., POPGENE, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis, Release.
- [10] Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L., 2000, Arlequin: A Software for Population Genetics Data Analysis, User Manual ver. 2.000, Genetics and Biometry Lab., Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- [11] Sharma, R.K., Gupta, P., Sharma, V., Sood, A., Mohapatra, T.B. and Ahuja, P.S., 2008, Evaluation of Rice and Sugarcane SSR Marker for Phylogenetic and Genetic Diversity Analyses in Bamboo, Genome 51: 91-103.