การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วงหิมพานต์ในภาคใต้ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลเทียมและเครื่องหมายอาร์เอพีดี

Genetic diversity of cashew in southern Thailand based on cashew apple morphology and RAPD markers

จรัสศรี นวลศรี[1*], กรกช นาคคนอง[1] และ กษมา เชิงฉลาด[1]

Charassri Nualsri[1*], Korakot Nakkanong[1] and Kasama Cherngchalard[1]

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วงหิมพานต์ (*Anacadium occidentale* L.) ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในภาคใต้ของประเทศไทย และปลูกรวบรวมในพื้นที่ของสถานีวิจัยคลองหอยโข่งคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์จังหวัดสงขลาจำนวนต้นที่ศึกษาทั้งสิ้น 176 ต้น โดยพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลเทียมคือลักษณะทรงผลและสีผลเทียม85 ต้นร่วมกับการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีจากผลการศึกษาพบความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของผลเทียมสามารถจำแนกได้ลักษณะละ 3 กลุ่ม พบลักษณะผลเทียมเป็นแบบทรงกรวยสีเหลืองมากที่สุดจากนั้นทำการศึกษาด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ 9 ไพรเมอร์ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 87 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 57 แถบคิดเป็น 65% ของแถบทั้งหมด เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้มาสร้างเดนโดรแกรม เพื่อหาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA จากโปรแกรม NTSYS (Version 2.1) พบว่าสามารถแยกกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 0.55-1.00 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.75

คำสำคัญ: ผลเทียม, เครื่องหมายอาร์เอพีดี, ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

ABSTRACT: The aim of the present study is to analyze genetic diversity of cashew (*Anacadium occidentale* L.) collected from different places in southern Thailand and grown in Khlong Hoi Khong research station, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla province. One hundred and seventy six plants were investigated. Genetic diversity was first evaluated based on two morphological characters of cashew apple including shape, color and further evaluated by RAPD technique. Results obtained from cashew apple characteristics from 85 plants showed that both the apple shape and color could be distinguished into three types each. Based on nine chosen RAPD primers, a total of 87 fragments were generated and among those 57 fragments (65%) were polymorphic. Genetic similarity between samples was then analyzed based on polymorphic bands by UPGMA using the NTSYS program (version 2.1). The similarity coefficient was in the range of 0.55-1.00 with an average of 0.75. From constructed dendrogram, 176 plants could be separated into 3 clusters.

Keywords: cashew apple, RAPD, genetic similarity

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา 90112
Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai campus, Songkhla 90112

* Corresponding author: ncharass@yahoo.com

บทนำ

มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale*) เป็นไม้ผลที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกับมะม่วง (Anacardiaceae) มีถิ่นกำเนิดจากบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล ในสหรัฐอเมริกาเมล็ดมะม่วงหิมพานต์นั้นมีราคาแพงเป็นอันดับ 2 รองจากแมคคาเดเมียในกลุ่ม nut ผู้ผลิตเมล็ดมะม่วงหิมพานต์รายใหญ่คือเวียดนาม ไนจีเรีย อินเดีย และบราซิล ส่วนประเทศที่นำเข้าคือ สหรัฐอเมริกาและกลุ่มอียู มะม่วงหิมพานต์เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางไม่ผลัดใบ ความสูงประมาณ 6-12 เมตร ทรงพุ่มกว้าง 4-10 เมตร เป็นไม้เนื้ออ่อน ใบหนาคล้ายรูปไข่ผิวมันลื่น ดอกมี 2 ประเภท คือ ดอกแยกเพศ (ดอกตัวผู้ และดอกตัวเมีย) และดอกสมบูรณ์เพศ (ดอกกระเทย) ดอกตัวผู้มี 5 กลีบ อยู่บริเวณด้านข้างช่อดอกจำนวน 8-10 อันส่วนดอกตัวเมียจะอยู่ตรงปลายช่อดอก ดอกตัวเมียจะอยู่ตรงปลายช่อดอกมีรังไข่สีเหลืองอ่อน เมื่อได้รับการผสมจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองปนขาว ส่วนของดอกที่ได้รับการผสมแล้ว ฐานรองดอกจะมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น เรียกว่าผลเทียม (cashew apple) เมื่อสุกจัดจะมีหลายสี ตั้งแต่สีเหลืองจนถึงแดงคล้ำ ลักษณะคล้ายชมพู่ มีหลายรูปทรง ส่วนผลแท้ คือส่วนของเมล็ดที่มีรูปร่างคล้ายไตติดอยู่ส่วนปลายสุดของผล เมื่อโตเต็มที่ขนาดของเปลือกจะลดลง เปลือกแข็งขึ้น เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมเทาปัจจุบันปลูกกันแพร่หลายในภูมิภาคเขตร้อนเพื่อใช้ประโยชน์จากเมล็ดและผล ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูงประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เอ บี อี เกลือแร่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็กเป็นต้น (องค์การสวนพฤกษศาสตร์ สำนักนายกรัฐมนตรี, 2538)

ทั่วโลกมีสายพันธุ์มะม่วงหิมพานต์มากกว่า 400 สายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่เป็นการค้ามีเพียงไม่กี่พันธุ์ ซึ่งในประเทศไทยนำเข้ามาปลูกครั้งแรกที่ภาคใต้เมื่อปี พ.ศ. 2444 โดยพระยารัษฎานุประดิษฐ์ มหิศรภักดี แต่ในปัจจุบันสามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย เนื่องจากมะม่วงหิมพานต์เป็นพืชทนแล้ง ปลูกง่าย เจริญเติบโตเร็ว ขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิดที่ระบายน้ำดี หน้าดินลึกไม่เป็นดินดาน ไม่เป็นดินด่างจัด หรือกรดจัด จึงมีการส่งเสริมและขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้นกรมวิชาการเกษตรได้ทำการคัดเลือกพันธุ์มะม่วงหิมพานต์มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2509 ปัจจุบันมีพันธุ์แนะนำ คือ พันธุ์ศรีสะเกษ 60-1 และ พันธุ์ศรีสะเกษ 60-2 พันธุ์ดังกล่าวมีความเหมาะสมในการนำไปขยายพันธุ์ด้วยวิธีการที่นิยม คือวิธีการเสียบยอด (กรมวิชาการเกษตร. 2553) คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้มีการรวบรวมมะม่วงหิมพานต์พันธุ์ดีจำนวนหนึ่งมาปลูกไว้ ณ สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา เพื่อใช้เป็นแหล่งในการปรับปรุงพันธุ์ แต่เนื่องจากข้อมูลพันธุ์ยังไม่ชัดเจน ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ จึงศึกษาความหลากหลายพันธุ์มะม่วงหิมพานต์ที่เก็บรวบรวม โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของผลเทียมในเบื้องต้น และใช้เทคนิค RAPD ยืนยันผล

วิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่างของมะม่วงหิมพานต์จากแหล่งต่าง ๆ ในภาคใต้ของประเทศไทย ปลูกรวบรวมในพื้นที่ของสถานีวิจัยคลองหอยโข่งคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลาจำนวนต้นที่ศึกษาทั้งสิ้น 176ต้น ทำการสุ่มเก็บผลเทียม (cashew apple) จำนวนต้นละ 5 ผล จาก 85 ต้น โดยคัดเอาเฉพาะผลที่สุกแก่เต็มที่และยังติดอยู่บนต้น เพื่อนำมาพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลเทียมคือลักษณะทรงผลและสีผลเทียม นอกจากนี้ยังนำชิ้นส่วนของขั้วผลอ่อนจากทั้ง 176 ต้นมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Rout และคณะ (2002) จากนั้นหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรส เข้มข้น 0.75 % แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตรแล้วเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัด

ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ 60 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ *Taq polymerase*เข้มข้น 1.5 ยูนิต 10X *Taq* buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTP เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยอุณหภูมิที่เริ่มต้นใช้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย 30 รอบ ด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 53 องศาเซลเซียส 3 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และรอบสุดท้ายตามด้วย 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาตรวจสอบผลด้วยวิธี electrophoresisนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจากวิธีของ Jaccard (1908) และสร้างเดนโดรแกรมโดย UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) ด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version-2.1 (NTSYS Version-2.1) (Rohlf, 2002)

ผลการศึกษา

ศึกษาลักษณะผลเทียมจากต้นมะม่วงหิมพานต์ จำนวน 85 ต้น (จากตัวอย่างที่ศึกษาทั้งสิ้น 176 ต้น เนื่องจากบางต้นไม่ติดผลหรือผลร่วงก่อนถึงระยะสุกแก่)โดยพิจารณาจากลักษณะรูปทรงและสีผลเทียม พบว่าในแต่ละต้นลักษณะผลเทียมจะเหมือนกันทั้งหมดซึ่งสีผลเทียม สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (**Figure 1A-1C**) คือสีเหลือง สีส้มและสีแดงผลเทียม สีเหลืองมีจำนวนมากที่สุดคือ 48ต้นคิดเป็น 56.47% ส่วนลักษณะรูปทรงของผลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มเช่นกัน คือ ทรงกรวย ทรงกระบอก และทรงกลม (**Figure 1D-1F**) ซึ่งลักษณะที่พบมากที่สุดคือ รูปร่างแบบทรงกรวย จำนวน 45 ต้น คิดเป็น 52.94% (**Table 1**)

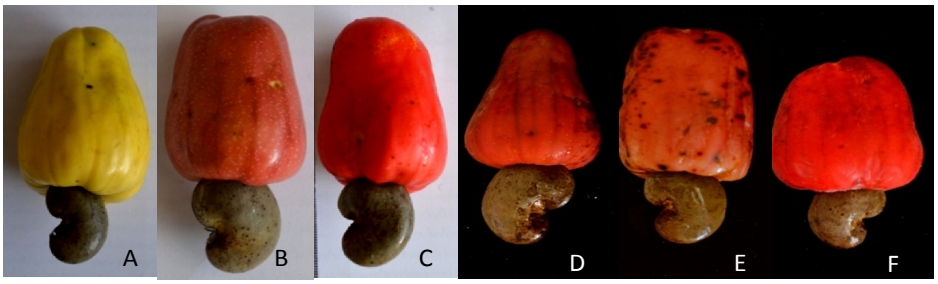

Figure 1 Color (A-C) and shape (D-F) of cashew apple:A. Yellow, B. Orange and C. Red D. Conical, E. Cylindrical and F. Round

Table 1 Plant number and number ofplants with each of the cashew apple morphological descriptor.

Morphological descriptor		Plant number	No. of Plants / total
Apple color	Yellow	3,5,25,26,31,32,37,38,47,51,52,58,65,70,85,86,87,95, 98,101,103,108,111,112,126,128,130,131,133, 134,139,140,142,143,146,148,151,158,160,164, 165,166,168,169,172,173,174,176	48/85(56.47%)
	Orange	4,14,18,45,46,53,62,63,72,76,96,116,119,144,145, 147,155,156,159,167,171	21/85 (24.07%)
	Red	6,16,17,19,23,24,41,49,78,107,136,157,161,162,163,170	16/85 (18.82%)
Apple shape	Conical	3,14,16,31,37,38,41,47,49,52,53,58,62,63,76,86,87,98,101,103,111,112,126,128,134,136,139,142,143, 144,145,147,148,151,155,158,159,160,162,164,165,168,169,174,176	45/85 (52.94%)
	Cylindrical	4,5,18,25,26,45,65,70,72,96,107,119,131,133,156,157,161,166,173	19/85 (22.35%)
	Round	6,17,19,23,24,32,46,51,78,85,95,108,116,130,140,146,163,167,170,171,172	21/85 (24.70%)

ผลจากการทดสอบตัวอย่างกับไพรเมอร์เบื้องต้น จำนวน 42 ไพรเมอร์ โดยใช้ขั้วผลอ่อนมะม่วงหิมพานต์ 176 ต้น เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ พบว่า มีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือ OPA-15, OPC-07, OPC-13, OPD-09, OPE-11, OPJ-05, OPK-02, OPN-07 และ OPR-01 ซึ่งตัวอย่างพืชให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 87แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 57 แถบ คิดเป็น 65 % (**Table 2**) ซึ่งนับว่าค่อนข้างสูง ตัวอย่างรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดีพีซีอาร์ ดังแสดงใน **Figure 2** จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของมะม่วงหิมพานต์รวมทั้งหมด 176 ตัวอย่าง โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis และ ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมตามวิธีของ Jaccard (1908) ด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version-2.1 (NTSYS Version 2.1) (Rohlf, 2002) พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (**Figure 3**) โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 0.552-1.000 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.749

Table 2 Primers producing polymorphic DNA bands in RAPD patterns of *Anacardium occidentale*.

Primer	Sequence (5'→3')	Amplified fragments	Monomorphic fragments	Polymorphic fragments	Polymorphism (%)
OPA-15	TTC CGA ACC C	7	4	3	42.86
OPC-07	GTC CCG ACG A	6	3	3	50
OPC-13	AAG CCT CGT C	16	4	12	75
OPD-09	CTC TGG AGA C	6	4	2	33.33
OPE-11	GAG TCT CAG G	8	2	6	75
OPJ-05	CTC CAT GGG G	12	4	8	66.66
OPK-02	GTC TCC GCA A	10	1	9	90
OPN-07	CAG CCC AGA G	11	0	11	100
OPR-01	TGC GGG TCC T	11	8	3	27.27
Total		87	30	57	65

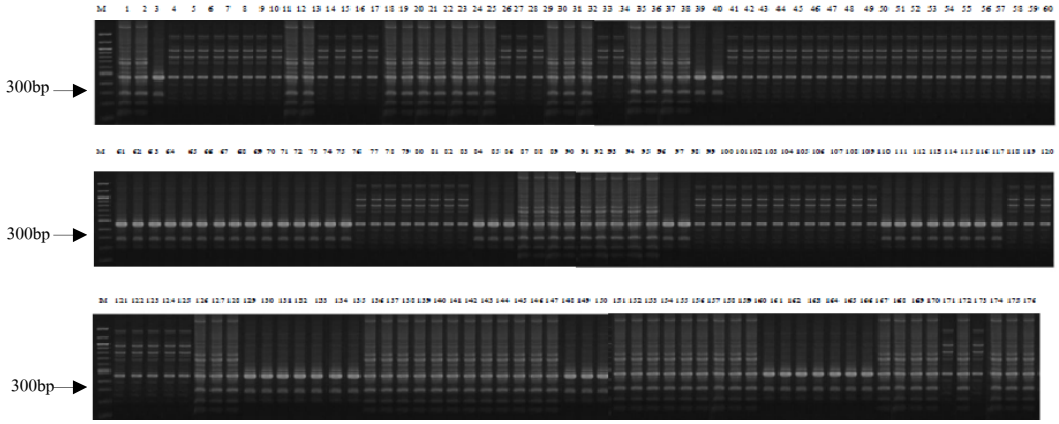

Figure 2 RAPD profiles of *Anacardium occidentale* for primer OPC-13. M isDNA Ladder size 100 bp.

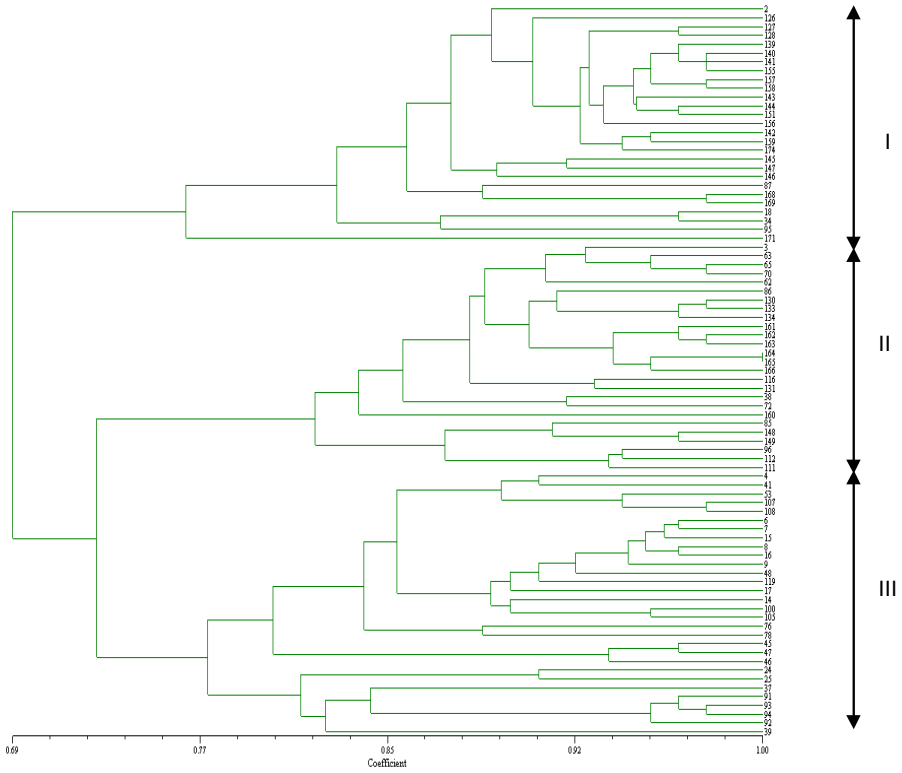

Figure 3. Dendrogram showing the relationship between 176 *Anacardium occidentale*plants based on RAPD analysis with 9 primers.

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลเทียมในมะม่วงหิมพานต์ โดยใช้สีและรูปทรงของผลเป็นเกณฑ์ในการจำแนก พบว่าสามารถจำแนกสีผลเทียมได้ 3 สี คือ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง และรูปทรงของผลเทียมจำแนกได้ 3 แบบ คือ แบบกรวย ทรงกระบอก และทรงกลม หากจำแนกตามลักษณะสีผลเทียมและรูปร่างผลเทียมร่วมกันแล้ว สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มย่อย 9 กลุ่ม จาก 85 ต้น คือ ผลเทียมสีเหลืองทรงกรวยจำนวน 31 ต้น สีเหลืองทรงกระบอก 8 ต้น สีเหลืองทรงกลม 9 ต้น สีส้มทรงกรวย 7 ต้น สีส้มทรงกระบอก 10 ต้น สีส้มทรงกลม 4 ต้น สีแดงทรงกรวย 5 ต้น สีแดงทรงกระบอก 3 ต้น และสีแดงทรงกลม 8 ต้น ซึ่งเป็นลักษณะทางสัณฐานที่ใกล้เคียงกับการศึกษาเบื้องต้นของ Ramiakajato (2001) ซึ่งได้กล่าวไว้ว่าสีของผลเทียมจะไล่ตั้งแต่สีเหลืองจนถึงสีแดง โดยที่บางครั้งไม่อาจจำแนกระหว่างสีเหลือง ส้ม และแดง ได้อย่างชัดเจนส่วนรูปทรงของผลนั้นนักวิจัยรายงานว่า สามารถจำแนกออกได้เป็น 4 แบบ คือ แบบทรงกรวย ทรงกระบอก (เส้นผ่านศูนย์กลางหัวและท้ายใกล้เคียงกัน) ทรงเหลี่ยม (มีความกว้าง ยาว หนาของผลเท่ากัน) และ ทรงลูกแพร์แต่จากการศึกษารูปทรงของผลเทียมมะม่วงหิมพานต์ในภาคใต้ครั้งนี้พบว่าลักษณะรูปทรงผลเพียง 3 แบบ

จากการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างต้นพืชด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ 9 ไพรเมอร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 87 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 57 แถบคิดเป็น 65% ของแถบทั้งหมดค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.55-1.00 เฉลี่ย 0.75 ใกล้เคียงกับงานทดลองของ Archak et al.

(2003) ที่ศึกษาในมะม่วงหิมพานต์ 35 ตัวอย่างโดยเทคนิคอาร์เอพีดี และไมโครแซทเทลไลท์พบค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม 0.42-0.90 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.69 และยังพบว่า การแบ่งกลุ่มโดยใช้ลักษณะสัณฐานและสายประวัติของพันธุ์ไม่มีความสัมพันธ์กัน ในการทดลองครั้งนี้พบว่าการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่แต่ผลจากการแยกกลุ่มดังกล่าวกลับไม่ได้มีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลเทียม สอดคล้องกับงานทดลองของ Thimmappaiahและคณะ (2009) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่ความใกล้เคียงกันในลักษณะสัณฐาน อาจมีความแตกต่างกันในระดับจีโนไทป์ (Samal et al., 2003) ในการศึกษาจำนวนตัวอย่างจำนวน 176 ต้น มีอยู่ 2 ต้น คือหมายเลข 164 และ 165 ที่มีรูปแบบของดีเอ็นเอเหมือนกันให้ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 1.0 ซึ่งเป็นไปได้ว่า 2 ต้นอาจมาจากต้นพ่อและแม่เดียวกัน จำนวนไพรเมอร์เพียง 9 ชนิด ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ชัดเจน อาจต้องมีไพรเมอร์มากกว่านี้เนื่องจากต้นมะม่วงหิมพานต์ทั้งหมดได้จากการเพาะเมล็ด ดังนั้นแต่ละต้นจึงมีจีโนไทป์ไม่เหมือนกัน

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2553. คำแนะนำการปลูกมะม่วงหิมพานต์. ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์ สำนักนายกรัฐมนตรี. 2538. พรรณไม้สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 2. โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮาส์:กรุงเทพฯ.

Archak, S., A.B. Gaikwad, D. Gautam, E.V.V.B. Rao, K.R.M. Swamy and J.L. Karihaloo. 2002. DNA fingerprinting of Indian cashew *(Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD and ISSR technique. Euphytica 230: 397-404.

Jaccard, P.1908. Nouvellers recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Sociète Vaudense des Sciences Naturelles 44: 233-270.

Ramiakajato, V. 2001. Morphology and selection of high yielding cashew *(Anacardium occidentale* L.) strains for Maputaland, South Africa. M.S. Thesis. University of Zululand.

Rohlf, F.J. 2002. NTSYS – pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version- 2.1. New York: Applied Biostatistics.

Rout, G. R., S. Samal, S. Nayak, M. Rashmi, P.C. Nanda, and P. Lenka. 2002. An alternative method of plant DNA extraction of cashew (*Anacardium occidentale* L.) for Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. Gartenbauwissenschaft 67 (3): 114–118.

Samal, S., G.R. Rout and P.C. Lenka. 2003. Analysis of genetic relationships between populations of cashew *(Anacardium occidentale* L.) by using morphological characterization and RAPD marker. Plant soil Environment 49: 176-182.

Thimmappaiah, S.W.G., D. Shobha and G.S. Melwyn. 2009. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR. Scientia Horticulturae 120: 411-417.