การจำแนกสายพันธุ์ของข้าวฟ่างหวานที่ปลูกในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิค RAPD

สิริมา ว่องไวโรจน์[1] พัชณี แสงทอง[4]
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200 ประเทศไทย
คมสัน อำนวยสิทธิ์[2] และ สุภาวดี ศรีแย้ม[3*]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา น่าน อ.ภูเพียง จ.น่าน 55000 ประเทศไทย

บทคัดย่อ

ข้าวฟ่างหวานจัดเป็นพืชที่ได้รับความสนใจและนำมาศึกษาวิจัยเพื่อใช้เป็นพืชพลังงานแหล่งหนึ่ง โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือได้มีการปรับปรุงข้าวฟ่างพันธุ์พื้นเมืองให้มีความหวานเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวฟ่างหวาน โดยในขั้นต้นได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบของข้าวฟ่างหวาน 2 วิธี คือวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) และการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant II พบว่าการสกัดทั้งสองวิธีนั้นให้จีโนมิก ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณสูงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปมาวิเคราะห์ความหลากหลายพันธุกรรมของข้าวฟ่างหวานด้วยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD 4 แบบ ได้แก่ S23 (5´AGTCAGCCAC3´), S24 (5´AATCGGGCTG3´), S27 (5´GAAACGGGTG3´) และ S30 (5´GTGATCGCAG3´) แล้วทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิส พบว่าอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ มีค่าเท่ากับ 38.0 36.0 36.4 และ 36.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Image Quant TL v7.01 พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นมีทั้งหมด 87 แถบและมีความแตกต่างกัน 73 แถบ (คิดเป็น Total number of polymorphic bands หรือ TPB ร้อยละ 83) โดยไพรเมอร์ RAPD S24 ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความหลากหลายสูงสุดถึง 24 แถบ (คิดเป็นค่า TPB ร้อยละ 93) ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 148 ถึง 1850 bp และไพรเมอร์ RAPD S23 ให้จำนวนแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์น้อยที่สุดเพียง 12 แถบ (คิดเป็นค่า TPB ร้อยละ 66) มีขนาดตั้งแต่ 285 ถึง 1763 bp จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าความแตกต่างที่เป็น RAPD markers นี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการหาสายพันธุ์อื่นของข้าวฟ่างหวานต่อไป

คำสำคัญ : จีโนมิกดีเอ็นเอ / การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล / เทคนิค RAPD / ความหลากหลายทางพันธุกรรม

---

* *Corresponding author; E-mail: supawadee__s@rmutl.ac.th, โทรศัพท์: +66(54)-775-391*

1 *นักศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์*

2 *รองศาสตราจารย์ สาขาพืชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร*

3 *อาจารย์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร*

4 *อาจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์*

Classification of Sweet Sorghum in Northern of Thailand Using Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Sirima Wongwairot[1], Padchanee Sangthong[4]

Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200 Thailand

Komsan Amnueysit[2], and Supawadee Sriyam[3*]

Rajamangala University of Technology Lanna Nan, Phu Phiang, Nan 55000 Thailand

Abstract

The genetic diversity of local sweet sorghum in Northern of Thailand has been studies. Sweet sorghum is an alternative plant for fuel substitution. Genomic DNA was isolated from leaves of sweet sorghum using cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) and NucleoSpin®Plant kit. The results showed that genomic DNAs from both methods have given high yield and quality. Then, the genomic DNA samples from NucleoSpin® Plant kit were used as DNA templates in Random amplified polymorphic DNA. In this study, four types of RAPD primers were used which were S23 (5´AGTCAGCCAC3´), S24 (5´AATCGGGCTG3´), S27 (5´GAAACGGGTG3´) and S30 (5´GTGATCGCAG3´). It was found that the optimal annealing temperature of each primer were 38.0, 36.0, 36.4 and 36.0 ºC, respectively. In addition, the bands of PCR products were analyzed by Image Quant TL v7.01. Total PCR products of 87 bands were observed and 73 bands of these were polymorphic bands. Total number of polymorphic bands (TPB) was calculated to 83%. RAPD primer S24 has given the highest polymorphic bands (24 bands, TPB = 93%) with PCR product sizes from 148 to 1850 bp, while RAPD primer S23 has showed the lowest polymorphic bands (12 bands, PPB = 66%) with size ranges from 276 to 1796 bp. These RAPD markers will be useful for genetic identification of sweet sorghum cultivars.

Keywords : Genomic DNA / Molecular Analysis / RAPD Technique / Genetic Diversity

* *Corresponding author; E-mail: supawadee__s@rmutl.ac.th ; Tel: +66(54)-775-391*

1 *Undergraduate Student, Department of Chemistry, Faculty of Science.*

2 *Associate Professor, Department of Plant Science, Faculty of Science and Agricultural Technology.*

3 *Lecturer, Department of Agro-Industry, Faculty of Science and Agricultural Technology.*

4 *Lecturer, Department of Chemistry, Faculty of Science.*

1. บทนำ

ปัจจุบันความต้องการในการใช้พลังงานของประเทศเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากวิกฤติการณ์ขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงและมลพิษทางอากาศจากการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนอกไซด์ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดสภาวะเรือนกระจกในชั้นบรรยากาศโลก ส่งผลกระทบต่อทั้งเศรษฐกิจและสภาพแวดล้อมในประเทศต่างๆ ทั่วโลก รัฐบาลจึงให้ความสำคัญกับการส่งเสริมการพัฒนาพลังงานทดแทนขึ้นมาใช้ประโยชน์มากขึ้น อาทิพืชพลังงานทดแทนที่ใช้เป็นวัตถุดิบเสริมสำหรับการผลิตเอทานอล ในปัจจุบันที่พบได้แก่การใช้มันสำปะหลังและอ้อย ต่อมามีการศึกษาวิจัยพัฒนาโดยนำข้าวฟ่างหวานมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ซึ่งพบว่าข้าวฟ่างหวานมีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้ดีเนื่องจากน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานมีความหวานใกล้เคียงกับอ้อย และมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่ามันสำปะหลัง ดังนั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานจึงสามารถนำไปหีบเพื่อเอาน้ำคั้นมาหมักเป็นเอทานอลได้โดยตรง [1] นอกจากนี้ข้าวฟ่างหวานยังเป็นพืชอายุสั้นสามารถเก็บเกี่ยวได้ภายในระยะเวลา 100-120 วัน ในขณะที่อ้อยต้องใช้เวลาหนึ่งปีเต็ม

สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีเกษตรกรที่ปลูกข้าวฟ่างหวานพันธุ์พื้นเมืองในภาคต่างๆ โดยเฉพาะบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือบางส่วน โดยปลูกไว้เพื่อบริโภคภายในครัวเรือนเท่านั้น เพื่อใช้ประโยชน์จากลำต้นและเมล็ด ในการทำเป็นน้ำเชื่อม น้ำข้าวฟ่างสดและน้ำตาลจากข้าวฟ่าง ส่วนเมล็ด ใบ และลำต้นที่เหลือจากการหีบน้ำจากลำต้นข้าวฟ่างหวานนำไปเลี้ยงสัตว์จำพวกเคี้ยวเอื้องได้ โดยในส่วนลำต้นของข้าวฟ่างหวานมีองค์ประกอบเทียบเท่ากับน้ำตาลที่ได้จากอ้อย จากคุณสมบัติดังกล่าวของข้าวฟ่างหวานสามารถนำมาใช้ทดแทนอ้อยและมันสำปะหลัง โดยใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นหรือวัตถุดิบเสริมในการผลิตเอทานอลได้ [2]

อย่างไรก็ตามลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานยังมีการผันแปรเนื่องจากผลกระทบจากสภาพแวดล้อมค่อนข้างสูง ทั้งในลักษณะเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยปัจจัยแวดล้อมหลักที่ทำให้ข้าวฟ่างหวานมีลักษณะแตกต่างกันคือ ช่วงแสง ความเข้มของแสง ปริมาณน้ำ และอุณหภูมิ โดยเฉพาะเมื่อปลูกในพื้นที่และฤดูปลูกที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ข้าวฟ่างหวานมีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกัน ทั้งค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดหรือค่าความหวานและสายพันธุ์ ซึ่งในปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวกับข้าวฟ่างหวานมีจำกัดและประเทศไทยยังไม่มีการปลูกเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ [3] ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายเพื่อการจำแนกทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานจึงมีความสำคัญเพื่อรวบรวมข้อมูลสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานและหาเอกลักษณ์ที่สำคัญในแต่ละสายพันธุ์ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานให้ได้น้ำคั้นจากลำต้นที่มีความหวานสูงขึ้นและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอลได้มากขึ้นและเพียงพอต่อความต้องการในอนาคต

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างใบข้าวฟ่างหวานพันธุ์พื้นเมืองในเขตภาคเหนือ

ข้าวฟ่างหวาน มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Sorghum bicolor* (Linn.) Moench ซึ่งตัวอย่างใบข้าวฟ่างหวานที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้ถูกปรับปรุงพันธุ์จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดและข้าวฟ่างหวาน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา เขตพื้นที่พิษณุโลก โดยแสดงรหัสตัวอย่างและค่าปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total solid soluble หรือ TSB) ที่วัดได้จากลำต้นข้าวฟ่างหวานดังแสดงในตารางที่ 1 โดยหลังจากการเก็บตัวอย่างใบสดข้าวฟ่างหวานแล้ว เก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็ง -20 องศาเซลเซียส ไว้จนกว่าจะนำมาศึกษาวิจัย

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid, TSS) ในตัวอย่างข้าวฟ่างหวาน

ตัวอย่างข้าวฟ่างหวานหมายเลข	ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด
1	13.8
2	14.0
6	13.4
8	15.0
16	13.0
22	15.5
38	12.5
42	13.0

2.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวฟ่างหวาน

2.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวฟ่างหวานโดยวิธี CTAB [4]

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวฟ่างหวานได้ดำเนินตามวิธีของ Sharma และคณะ [4] มีรายละเอียดดังต่อไปนี้ ชั่งตัวอย่างใบข้าวฟ่างหวานประมาณ 0.5-1.0 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมสารละลายสำหรับการสกัดปริมาตร 700 ไมโครลิตร ประกอบด้วย CTAB 1 โมลาร์ Tris-HCl pH 8.0 0.5 โมลาร์ EDTA pH 8.0 5 โมลาร์ NaCl และ 2-mercaptoethanol ลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น Mini Spin plus, USA) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสลงในหลอดใหม่ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นตกตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์, pH 5.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเอทานอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อจีโนมิกดีเอ็นเอ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งนาน 10-30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำการล้างตะกอนของดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ตั้งตะกอนดีเอ็นเอทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-15 นาที ละลายตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร และวิเคราะห์คุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟเรซีสต่อไป

2.2.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวฟ่างหวานด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

ชั่งตัวอย่างใบข้าวฟ่างหวานน้ำหนักประมาณ 0.5-1.0 กรัม บดให้ละเอียดโดยใช้โกร่งบดตัวอย่างร่วมกับการใช้ไนโตรเจนเหลว เพื่อเตรียมตัวอย่างสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant II (MN, Germany) ซึ่งประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ PL1 สารละลายบัฟเฟอร์ PC สารละลายบัฟเฟอร์ PW2 สารละลายบัฟเฟอร์ PE NucleoSpin® filter และ NucleoSpin® column โดยมีขั้นตอนวิธีการสกัดดังนี้ คือนำตัวอย่างที่บดละเอียดใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PL1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตรและ RNase A ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายส่วนใสด้านบนลงใน NucleoSpin® filter นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา

2 นาที ปิเปตสารละลายที่ผ่าน NucleoSpin® filter ลงหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PC ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตสารละลายทั้งหมดลงใน NucleoSpin® column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่าน NucleoSpin® column ทิ้งไป และล้าง NucleoSpin® column ที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอติดอยู่ให้บริสุทธิ์โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PW2 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที โดยทำการล้าง NucleoSpin® column ซ้ำสองครั้ง ในครั้งที่สองจะใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ PW2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้วตั้ง NucleoSpin® column ทิ้งไว้ให้แห้งนานประมาณ 10 นาที จึงทำการชะจีโนมิกดีเอ็นเอจาก NucleoSpin® column โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที สำหรับขั้นตอนการชะจีโนมิกดีเอ็นเอจะทำสองซ้ำ เมื่อได้จีโนมิกดีเอ็นเอแล้วทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟเรซีสต่อไป

2.3 การตรวจสอบคุณภาพจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวฟ่างหวานด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟเรซีส

การวิเคราะห์คุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟเรซีส โดยชั่งผงอะกาโรสหนัก 0.75 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปิเปตเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปเขย่าให้เข้ากันทิ้งสารละลายให้เย็นลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเทลงในถาดของชุดอิเลคโตรโฟเรซีส ทิ้งไว้ให้เจลอะกาโรสแข็งตัว แล้วเทสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE ลงไปให้ท่วมเจล สูงประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร

สำหรับการวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอ ทำโดยปิเปตจีโนมิกดีเอ็นเอของใบข้าวฟ่างหวานที่สกัดได้จากข้อ 2.2.1 และ ข้อ 2.2.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลุมของเจลที่เตรียมไว้ พร้อมทั้งดีเอ็นเอมาตรฐานคือ λDNA / *Eco*RI + *Hin*dIII เพื่อใช้เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ปิดฝาเครื่องและต่อขั้วไฟฟ้าใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ที่ 120 โวลต์ เวลานาน 30 นาที หรือให้แถบสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ของความยาวเจล จากนั้นปิดแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปวิเคราะห์โดยการส่องด้วยเครื่อง UV transilluminator (ยี่ห้อ UVP, รุ่น LCD/M-20, Cambridge, UK) และบันทึกภาพ

2.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานด้วยเทคนิค RAPD [5]

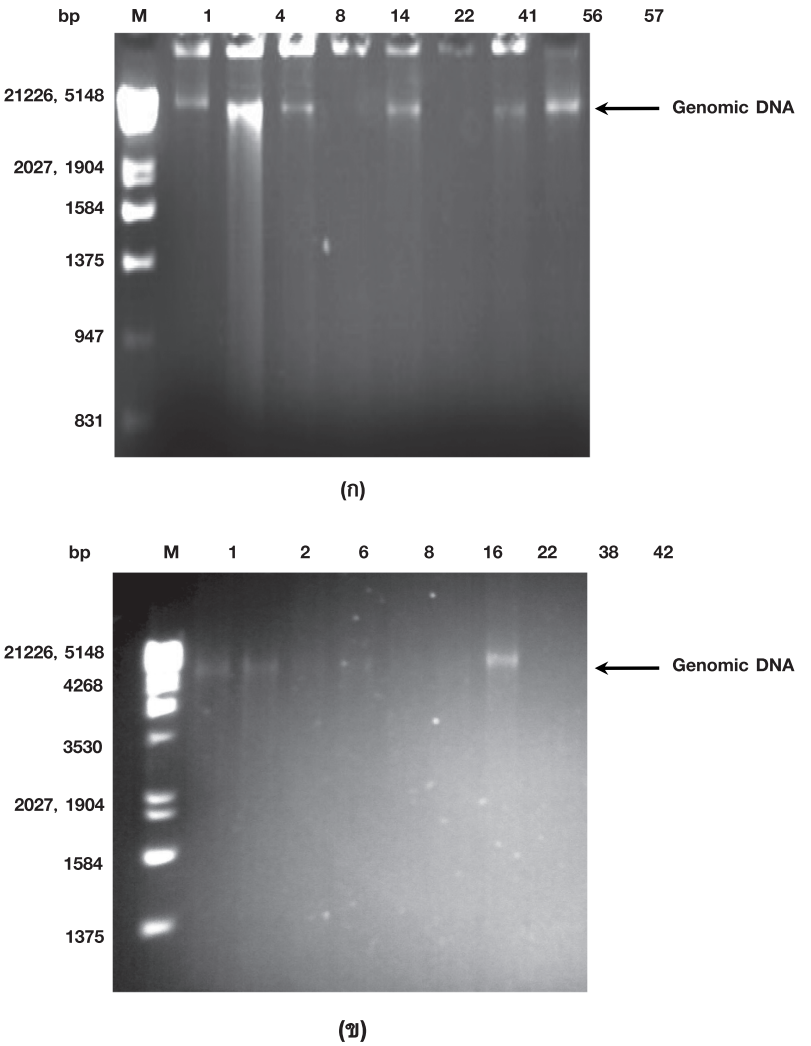
ใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 4 แบบ ได้แก่ S23 (5′AGTCAGCCAC3′), S24 (5′AATCG GGCTG3′), S27 (5′GAAACGGGTG3′) และ S30 (5′GTGATCGCAG3′) นำมาใช้ในปฏิกิริยา RAPD-PCR ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ซึ่งแต่ละปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 1) จีโนมิกดีเอ็นเอ 2) ไพรเมอร์ RAPD ความเข้มข้น 2 μM 3) น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 4) 2X i*Taq* DNA polymerase เครื่อง Thermal cycle (ยี่ห้อ Eppendorf, รุ่น Mastercycler® personal, Hamburg, USA) ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและจำนวนรอบ ดังนี้ 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94.0 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) annealing ที่อุณหภูมิ 33.0 ถึง 38.0 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 4) elongation ที่อุณภูมิ 72.0 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 30 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72.0 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยเครื่องอิเลคโตรโฟเรซีส โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และบันทึกภาพรูปแบบดีเอ็นเอ นำผลวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Quant TL v7.01 โดยนำผลแบบแผนดีเอ็นเอ (DNA pattern) ของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานที่ได้มาคำนวณหาค่าแสดงความหลากหลายของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความแตกต่างรวมทั้งหมด (Total number of polymorphic bands, TPB) โดยหาได้จากอัตราส่วนของจำนวนแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มี

ความแตกต่างรวมทั้งหมดต่อจำนวนแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในแต่ละไพรเมอร์ และความหลากหลายของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างแต่ละสายพันธุ์ (Number of polymorphic bands, PPB) ซึ่งหาได้จากอัตราส่วนของจำนวนแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในแต่ละตัวอย่างต่อจำนวนแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในแต่ละไพรเมอร์

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวฟ่างหวาน

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของใบข้าวฟ่างหวาน โดยจะใช้ใบอ่อน รวมทั้งหมดจำนวน 8 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธี คือวิธี CTAB และชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin®Plant II เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวฟ่างหวานที่สกัดได้จากทั้งสองวิธี แล้วทำการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟเรซีส แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 จีโนมิกดีเอ็นเอจากข้าวฟ่างหวาน 8 ตัวอย่าง โดย (ก) คือจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB และ (ข) คือจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin®Plant
(Lane M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน λDNA / *Eco*RI + *Hin*dIII)

พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวฟ่างหวาน ทั้ง 8 ตัวอย่างที่สกัดได้จากทั้งสองวิธีแสดงผลของแถบจีโนมิกดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวสรุปได้ว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพที่ดี นอกจากนี้ไม่พบแถบที่แสดงการแตกหักของดีเอ็นเอและการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอด้วย ซึ่งถือได้ว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้เหมาะสำหรับนำไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวฟ่างหวาน ด้วยวิธี RAPD - PCR นั้นจะใช้ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปเนื่องจากสะดวกและรวดเร็วในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบข้าวฟ่างหวาน จากรายงานผลการวิจัยของ Michiels และคณะ [6] ได้ศึกษาวิจัยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นจากใบของพืชโดยเปรียบเทียบระหว่างการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนและใบแก่ พบว่าใบอ่อนของพืชจะมีองค์ประกอบของสารประกอบประเภทพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) และพอลิฟีนอลิก (polyphenolic compounds) น้อยกว่าใบแก่ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในระหว่างการสกัดและเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนหรือนิวคลีอิกในรูปของตะกอนที่ไม่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้สารประกอบพอลิแซคคาไรด์และพอลิฟีนอลิกยังมีผลต่อการยับยั้งการสกัดดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาพีซีอาร์และการตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะได้ด้วย นอกจากนี้รายงานของ Jian และคณะ [7] กล่าวว่า สารประเภท CTAB หรือ Polyvinylpyrrolidone (PVP) หากเติมลงในสารสารละลายที่ใช้สกัดจะช่วยไปจับกับสารประกอบพอลิแซคคาไรด์และสารพอลิฟินอลิกได้ทำให้ได้จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีและสะอาดปราศจากสิ่งปนเปื้อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ใช้ตัวอย่างจากใบอ่อนของข้าวฟ่างหวานและสารละลายที่ใช้สกัดโดยเติมสาร CTAB ลงในสารละลายเพื่อช่วยจับกับสารประกอบพอลิแซคคาไรด์และพอลิฟินอลิกทำให้ผลจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบข้าวฟ่างหวานมีคุณภาพดีเทียบเท่ากับการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

3.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานด้วยเทคนิค RAPD

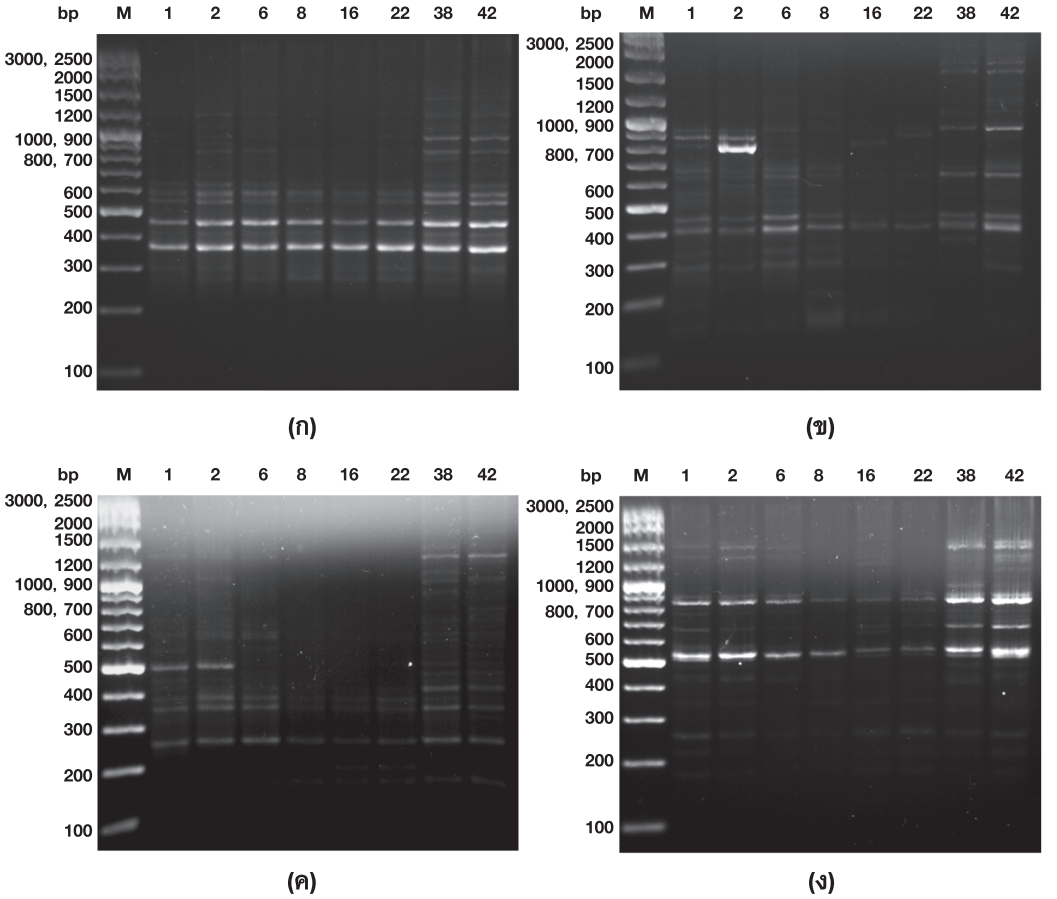
ผลการศึกษาหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละไพรเมอร์และแต่ละตัวอย่าง ในการทำปฏิกิริยา RAPD-PCR ซึ่งได้ทำการทดลองที่อุณหภูมิแตกต่างกันที่ 6 ระดับได้แก่ คือ 33.0 34.0 35.0= 36.0, 37.0 และ 38.0 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละไพรเมอร์คือ ไพรเมอร์ RAPD S23, S24, S27 และ S30 ในแต่ละตัวอย่างดังแสดงผลในตารางที่ 2 ซึ่งมีอุณหภูมิ annealing มีค่าระหว่าง 35.0 ถึง 38.0 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์และการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ

ตารางที่ 2 อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมในการทำ RAPD - PCR ของแต่ละตัวอย่างข้าวฟ่างหวาน

หมายเลขตัวอย่าง ไพรเมอร์ RAPD	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)								
	1	2	6	8	16	22	38	42	อุณหภูมิเฉลี่ย
S23	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0
S24	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0
S27	37.0	36.0	37.0	35.0	35.0	37.0	37.0	36.0	36.4
S30	36.0	36.0	37.0	38.0	35.0	35.0	35.0	36.0	36.0

จากนั้นผู้วิจัยได้เลือกใช้ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมแต่ละไพรเมอร์ RAPD มีค่าเท่ากับ 38.0 36.0 36.4 และ 36.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับนั้นมาศึกษาความหลากหลายของข้าวฟ่างหวานด้วย RAPD - PCR จากการทดลองพบว่าในทุกตัวอย่างของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าวฟ่างหวาน

ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีลักษณะแสดงแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความแตกต่างกันดังแสดงผลในรูปที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิ annealing ทั้ง 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้พบว่า อุณหภูมิ annealing ที่ใช้มีค่าต่ำกว่างานวิจัยของ Hülya [8] ซึ่งใช้อุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์ RAPD 12 แบบ (ความยาวไพรเมอร์ละ 10 นิวคลีโอไทด์) มีค่าเท่ากับ 42.0 องศาเซลเซียส มีรายงานการวิจัยพบว่าหากมีการใช้อุณหภูมิ annealing ที่สูงหรือต่ำเกินไปจากอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์นั้นๆ อาจส่งผลให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เป็นแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific band) รวมอยู่ด้วยทำให้ส่งผลต่อการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นได้ [5]



รูปที่ 2 แบบแผนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการทำ RAPD - PCR ของตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวฟ่างหวานทั้ง 8 ตัวอย่าง โดยใช้ที่อุณหภูมิ annealing เฉลี่ยของแต่ละไพรเมอร์ (Lane M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp Plus DNA Ladder)

โดย (ก) คือ ไพรเมอร์ RAPD S23; อุณหภูมิ annealing ที่ 38.0 องศาเซลเซียส

(ข) คือ ไพรเมอร์ RAPD S24; อุณหภูมิ annealing ที่ 36.0 องศาเซลเซียส

(ค) คือ ไพรเมอร์ RAPD S27; อุณหภูมิ annealing ที่ 36.4 องศาเซลเซียส และ

(ง) คือ ไพรเมอร์ RAPD S30; อุณหภูมิ annealing ที่ 36.0 องศาเซลเซียส

3.3 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวฟ่างหวานด้วยโปรแกรม Image Quant TL v7.01

จากการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Image Quant TL v7.01 โดยวิเคราะห์จากขนาดของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานรวมทั้งหาค่าเฉลี่ยของแถบที่ใกล้เคียงกันของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในแต่ละตัวอย่างได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ RAPD S23 S24 S27 และ S30 ในการทำปฏิกิริยา RAPD - PCR จะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้นทั้งหมด 87 แถบ ซึ่งมีขนาดของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แตกต่างกันจำนวน 73 แถบ คิดเป็นความหลากหลายของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความแตกต่างรวมทั้งหมดร้อยละ 83 โดยไพรเมอร์ RAPD S24 จะให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จำนวน 24 แถบซึ่งมีความหลากหลายมากที่สุดและให้ค่าความหลากหลายของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความแตกต่างรวมทั้งหมดของแต่ละไพรเมอร์ (TPB) เท่ากับ ร้อยละ 93 และไพรเมอร์ RAPD S23 มีจำนวนแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้นจำนวน 12 แถบ มีค่าความแตกต่างของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์น้อยที่สุดและให้ค่า TPB เท่ากับร้อยละ 66 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Chengxin และคณะ [9] ที่ทำการศึกษาความหลากหลายของพืชชนิด Changium smyrnioides ด้วยวิธี RAPD - PCR โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD S23 และ S24 ในการทำ RAPD - PCR เช่นเดียวกันพบว่า ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจากการใช้ไพรเมอร์ S23 มีจำนวน 10 แถบ (ค่า TPB ร้อยละ 70) และเมื่อใช้ไพรเมอร์ S24 จะมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้น 4 แถบ (ค่า TPB ร้อยละ 57) ซึ่งทั้งสองไพรเมอร์ มีค่า TPB ต่ำกว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมที่ใช้ในงานวิจัยของ Chengxin และคณะ [9] ที่อุณหภูมิสูงคือ 42.0 องศาเซลเซียส ทำให้จำนวนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อยกว่าและไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อการจับกับจีโนมิกดีเอ็นเอแม่แบบที่ดีกว่า ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ก็มีความจำเพาะมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นมีค่า PPB มาก แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายของสายพันธุ์สูง เนื่องจากมีแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่แตกต่างเกิดขึ้นจำนวนมาก แต่หากมีค่า PPB น้อยจะมีแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีความแตกต่างกันน้อย ทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์น้อยเช่นกัน

ซึ่งความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนั้นอาจบ่งบอกถึงความหลากหลายในตัวอย่างของข้าวฟ่างหวานพันธุ์พื้นเมืองของแต่ละตัวอย่างได้ อย่างไรก็ตามความแตกต่างของแบบแผนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากวิธี RAPD - PCR นั้นในการทดลองนี้ยังคงมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงอาจต้องใช้ไพรเมอร์ RAPD ในปฏิกิริยา RAPD - PCR ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ เพื่อเพิ่มการหาเครื่องหมายยีนหรือเอกลักษณ์ของสายพันธุ์โดยการนำแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ให้ความแตกต่างของสายพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันต่อไป

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ S23, S24, S27 และ S30 ของข้าวฟ่างหวานทั้ง 8 ตัวอย่าง

RAPD Primer	Number of amplied bands	Number of polymorphic bands (PPB)								Total number of polymorphic bands (TPB)
		1	2	6	8	16	22	38	42	
S23	18	8 (42)	4 (21)	7 (36)	9 (47)	11 (58)	6 (31)	2 (10)	3 (16)	12 (66)
S24	26	11 (42)	15 (57)	13 (50)	17 (65)	20 (77)	19 (74)	14 (58)	11 (43)	24 (93)
S27	21	6 (28)	9 (43)	10 (47)	16 (72)	16 (76)	15 (71)	5 (24)	8 (38)	19 (90)
S30	22	9 (41)	10 (45)	12 (54)	15 (68)	8 (36)	11 (50)	5 (23)	5 (23)	18 (82)
Average	22	8.50 (39)	9.50 (43)	10.50 (48)	14.25 (65)	13.75 (62)	12.75 (58)	6.50 (30)	6.75 (31)	18.25 (83)

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในวงเล็บแสดงเป็นค่าร้อยละของความแตกต่างของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อเทียบกับจำนวนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นในแต่ละไพรเมอร์

4. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวฟ่างหวานในเขตภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 8 ตัวอย่างด้วยเทคนิค RAPD - PCR พบว่า การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอทั้งวิธี CTAB และชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปนั้นให้จีโนมิกดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ ซึ่งไม่พบแถบที่แสดงการแตกหักของดีเอ็นเอและการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ ดังนั้นจีโนมิกดีเอ็นที่สกัดได้จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปมาศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวฟ่างหวานด้วยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD 4 แบบ ได้แก่ S23 S24 S27 และ S30 พบว่าอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์มีค่าเท่ากับ 38.0 36.0 36.4 และ 36.0 องศาเซลเซียสตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์แบบแผนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม Image Quant TL v7.01 พบความหลากหลายของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานในทั้ง 8 ตัวอย่าง โดยพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้นทั้งหมด 87 แถบ อยู่ในช่วง 18 ถึง 26 แถบ และมีขนาดตั้งแต่ 148 และ 1850 bp คิดเฉลี่ยเป็น 22 แถบต่อไพรเมอร์และมีแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความแตกต่างกัน 73 ใน 87 แถบ คิดเป็นค่าความหลากหลายของแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความแตกต่างรวมทั้งหมด (TPB) เท่ากับร้อยละ 83 ซึ่งมีค่า TPB ของแต่ละไพรเมอร์อยู่ระหว่างร้อยละ 66 ถึงร้อยละ 93 ซึ่งในแต่ละไพรเมอร์มีค่า PPB อยู่ระหว่างร้อยละ 10 ของไพรเมอร์ RAPD S23 และ ร้อยละ 77 ของไพรเมอร์ RAPD S24 โดยไพรเมอร์ RAPD S24 นี้จะให้ความหลากหลายของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้สูงที่สุดโดยมีค่า TPB เท่ากับร้อยละ 93 สำหรับไพรเมอร์ RAPD S23 นั้นให้ความหลากหลายของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ต่ำที่สุดและมีค่า TPB เท่ากับร้อยละ 66

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนาที่สนับสนุนทุนงานวิจัยและได้จัดทำโครงการส่งเสริมการผลิตผลงานวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา เขตพื้นที่พิษณุโลก ที่อนุเคราะห์สถานที่ปลูกและการเก็บตัวอย่างใบข้าวฟ่างหวาน ขอขอบคุณสาขาวิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา เขตพื้นที่น่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในงานวิจัยและความช่วยเหลือด้านต่างๆ ในการดำเนินการวิจัย จนคณะผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

1. Ratnavathi, C.V., Suresh, K., Vijay Kumar, B.S., Pallavi, M., Komala, V.V., and Seetharama, N., 2010, “Study on genotypic variation for ethanol production from sweet sorghum juice”, *Biomass and Bioenergy*, Vol. 34, No. 7, pp. 947-952.

2. Cunningham, R.L., 1988, “Extracted sweet sorghum substrates as a source of fermentable sugars”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 17, No. 13, pp. 117-124.

3. Prasit J., 1986, *Sweet Sorghum*, Faculty of Agriculture, Kasetsart University. (in Thai)

4. Sharma, R., Mahla, H.R., Mohapatra, T., Bhargava, S.C., and Sharma, M.M., 2003, “Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen”, *Plant Molecular Biology*, Vol. 21, pp. 43-50.

5. Padmalatha, K. and Prasad, M.N.V., 2006, “Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India”, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5, No. 3, pp. 230-234.

6. Michiels, A., Van den Ende, W., Tucker, M., Liesbet, V.R., and Laere, A.V., 2003, “Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants”, *Analytical Biochemistry*, Vol. 315, pp. 85-89.

7. Jian, Y., Anquan, J., Esteban, J. P., Xiufen, Z., Chengtao, J., Xingchun, Z., Lan, H., and Zheng, T.A., 2004, “A simple and efficient method for extracting DNA from old and burned bone”, *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 49, No. 4, pp. 1-6.

8. Hülya, I., 2003, “RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*”, *Scientia Horticulturae*, Vol. 97, No.3-4, pp. 211-218.

9. Chengxin, F., Yingxiong, Q., and Hanghui, K., 2003, “RAPD analysis for genetic diversity in *Changium smyrnioides* (Apiaceae), an endangered plant”, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Vol. 44, pp. 13-18.