การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ดีเนีย

Using Random Amplified Polymorphic DNA Technique for Studying the Genetic Relationship of *Gardenia* spp.

นฤมล ธนานันต์[1] รุจิเรข นพเกษร[2] และ ธีระชัย ธนานันต์[2]*

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Narumol Thanananta[1], Rujirek Nopgason[2] and Theerachai Thanananta[2]*

[1]Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkrrn Rajabhat University under Royal Patronage.

[2]Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre.

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ดีเนีย 9 พันธุ์ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 59 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกพุดทั้ง 9 พันธุ์ ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าสามารถจำแนกพุดสกุลการ์ดีเนียได้เป็น 4 กลุ่ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.81

คำสำคัญ : พุด อาร์เอพีดี ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to study the genetic relationship among 9 cultivated *Gardenia* spp. Seventy-two random primers were screened and 59 primers could be used for DNA amplification. Twenty primers which gave clear amplified products were selected and used to analyze all cultivars. The result showed significant differences among 9 cultivars having specific fragments for each cultivar. Furthermore, There are some primers which are able to identify all cultivars using only one primer. A dendrogram constructed based on polymorphic bands showed genetic similarities among *Gardenia* spp. and separated to 4 clusters with similarity coefficients ranging 0.38-0.81.

Keywords : *Gardenia*, RAPD (Random amplified polymorphic DNA), Genetic diversity

***Corresponding author.** E-mail: thana@tu.ac.th

บทนำ

พุดเป็นพรรณไม้พุ่มขนาดเล็ก มีมากมายหลากหลายชนิด จัดอยู่ในหลายวงศ์ ได้แก่ Apocynaceae, Oleaceae, Rubiaceae และ Solanaceae ลำต้นสูง 1-3 เมตร ผิวลำต้นสีขาวเทา แตกใบและกิ่งก้านตามข้อกิ่งรอบลำต้น ใบเป็นใบเดี่ยว รูปมนรีและแตกออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน ใบกว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 8-12 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ผิวใบเรียบสีเขียว ดอกเป็นดอกเดี่ยว ออกตามปลายยอดหรือปลายกิ่ง ดอกมีกลิ่นหอม กลีบดอกเรียงเป็นชั้นเดียวหรือซ้อนเป็นชั้นๆ ขึ้นอยู่กับพันธุ์ ดอกบานมีขนาด 2-5 เซนติเมตร มีผลเป็นฝักรูปทรงกระบอกแหลมโค้ง ภายในมีเมล็ด 3-5 เมล็ด (Bradshaw, 2003; Kobayashi & Kaufman, 2006; Han *et al*., 2007)

คนไทยในอดีตเชื่อว่าบ้านใดปลูกต้นพุดไว้ประจำบ้านจะทำให้มีความบริสุทธิ์ เนื่องจากพุดโดยทั่วไปมีกลีบดอกขนาดใหญ่ สีขาวสดใสแลดูสะอาดตา และจะทำให้มีความเจริญมั่นคงหรือแข็งแรงสมบูรณ์ เนื่องจากพุดมีเนื้อไม้ที่แข็งแกร่ง ประโยชน์ของพุดนอกจากเป็นไม้ดอกประดับตามสวนและนิยมนำดอกมาร้อยมาลัยแล้ว ยังสามารถสกัดกลิ่นจากดอกเพื่อทำเป็นหัวน้ำหอม นอกจากนี้ส่วนต่างๆ ของพุดยังเป็นสมุนไพร เช่น ใบแก้ไอ ดอกแก้โรคผิวหนัง ต้นใช้ขับพยาธิ เนื้อไม้ใช้ลดไข้ รากใช้บำรุงร่างกาย ระงับปวด แก้ปวดฟัน และขับพยาธิ (Lee *et al*., 2006)

จากบทความวิจัยของ Han *et al*. (2007) ซึ่งใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) ประเมินพุดซ้อน (*Gardenia jasminoides* Ellis) ทั้งพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูกในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน จำนวน 8 พันธุ์ พบว่าตัวอย่างพุดซ้อนที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ค่อนข้างสูง

ด้วยความสำคัญดังกล่าว จึงมีแนวคิดที่จะรวบรวมพันธุ์พุดในประเทศไทย เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) โดยเลือกศึกษาพุดสกุลการ์ดีเนีย (*Gardenia*) ในวงศ์ Rubiaceae ซึ่งเป็นพุดที่มีดอกสีขาวขนาดใหญ่และกลิ่นหอม รวมทั้งนิยมปลูกตามอาคารบ้านเรือนและเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีมูลค่าการตลาดสูงชนิดหนึ่ง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งสะดวกรวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่สามารถจำแนกและบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พุดสกุลการ์ดีเนีย รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ดีเนีย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการคุ้มครองพันธุกรรมและการอนุรักษ์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. พันธุ์พุด

ตัวอย่างพันธุ์พุดสกุลการ์ดีเนียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำแนกเป็น 3 ชนิด จำนวน 9 พันธุ์ ประกอบด้วย (1) *G. jasminoides* Ellis 6 พันธุ์ ได้แก่ พุดซ้อนใหญ่ พุดสเปน พุดซ้อนแคระ พุดซ้อนด่าง และพุดฮอลแลนด์ พุดเวียดนาม (2) *G. taitensis* DC. 2 พันธุ์ ได้แก่ พุดแสงอุษา และพุดอเมริกา และ (3) *G. carinata* Wallich. 1 พันธุ์ ได้แก่ พุดน้ำบุษย์ โดยปลูกในกระถางเพื่อเก็บใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอ

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพุดด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal *et al*. (1992) โดยบดในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด แล้วนำผงใบ 2 กรัม บ่มในบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer) [4x CTAB; 4% cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 2.8 M NaCl, 40 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) และ 200 mM Tris-HCl pH 8.0] 10 มิลลิลิตร ซึ่งมี 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงแยกสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย washing buffer (10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70% ethanol) ปล่อยให้แห้งและละลายตะกอนใน RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase A (10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาสกัดด้วยฟีนอล :

คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) 50 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al*., 1989)

3. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

มี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยรวมดีเอ็นเอพุดทั้ง 9 พันธุ์เป็นตัวอย่างเดียวกัน และ (2) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยคัดเลือกไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอพุดแต่ละพันธุ์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 0.25 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต (Wikie *et al*., 1993) โดยไพรเมอร์แบบสุ่มที่ใช้ 72 ชนิด คือไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จาก Wako Company (Japan) ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ (Wikie *et al*., 1993) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

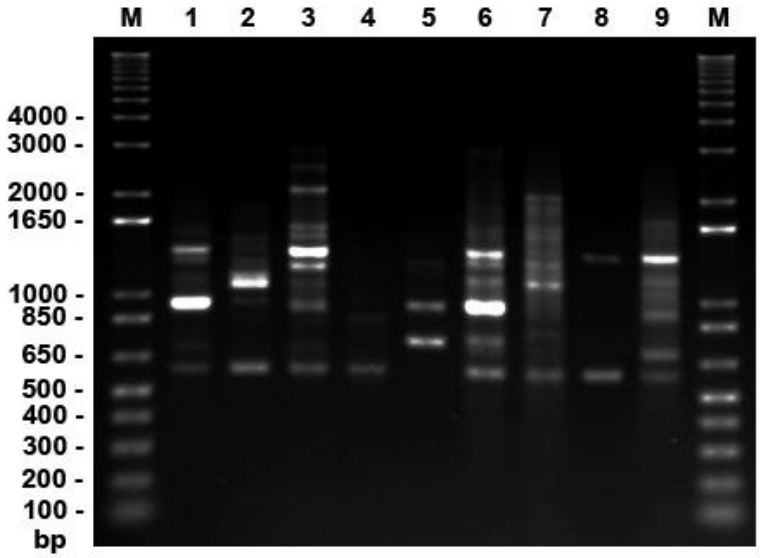
4. การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอพุดทั้ง 9 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี และเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

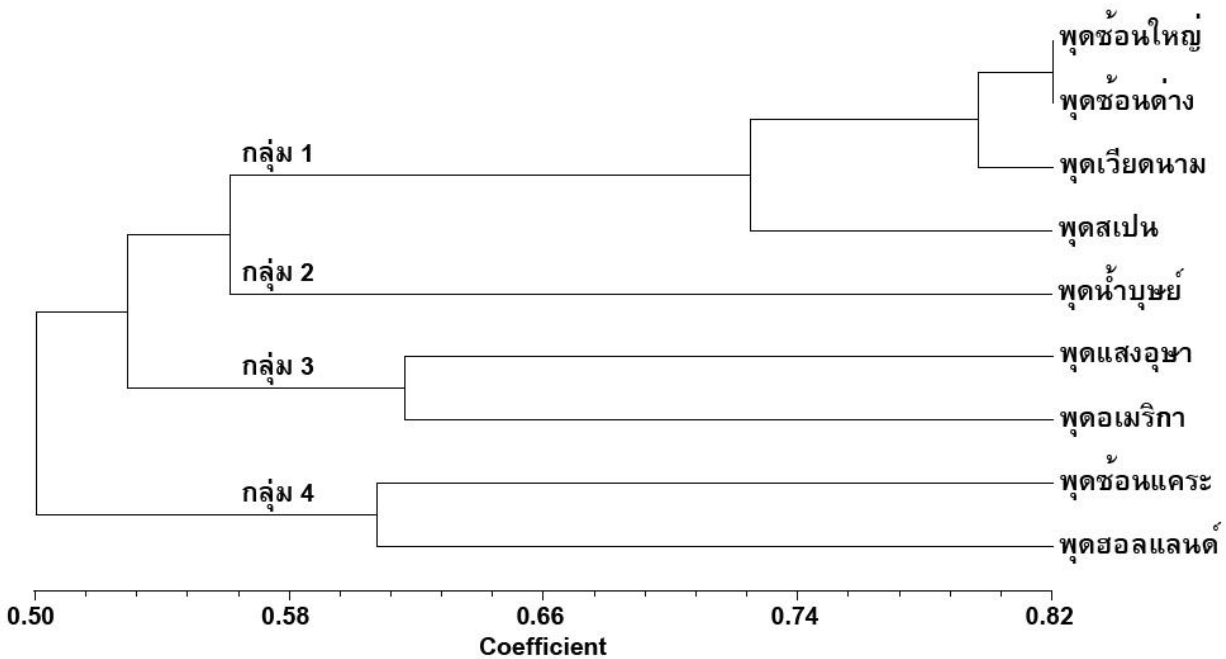
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของพุดด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 59 ชนิด หรือคิดเป็น 81.94 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หลังจากนั้นจึงคัดเลือกไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอพุดแต่ละพันธุ์ จำนวน 9 พันธุ์ ได้แก่ พุดซ้อนใหญ่ พุดแสงอุษา พุดสเปน พุดอเมริกา พุดซ้อนแคระ พุดซ้อนด่าง พุดน้ำบุษย์ พุดฮอลแลนด์ และพุดเวียดนาม ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 184 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 250-3,000 คู่เบส โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีมีรูปแบบจำเพาะต่อพุดแต่ละพันธุ์ (ภาพที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายอาร์เอพีดีสำหรับจัดจำแนกพันธุ์พุดได้ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของพุดแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ A29 (GGTTCGGGAATG), F25 (CCAGATCCGAAT) และ F29 (GCCGCTAATATG)

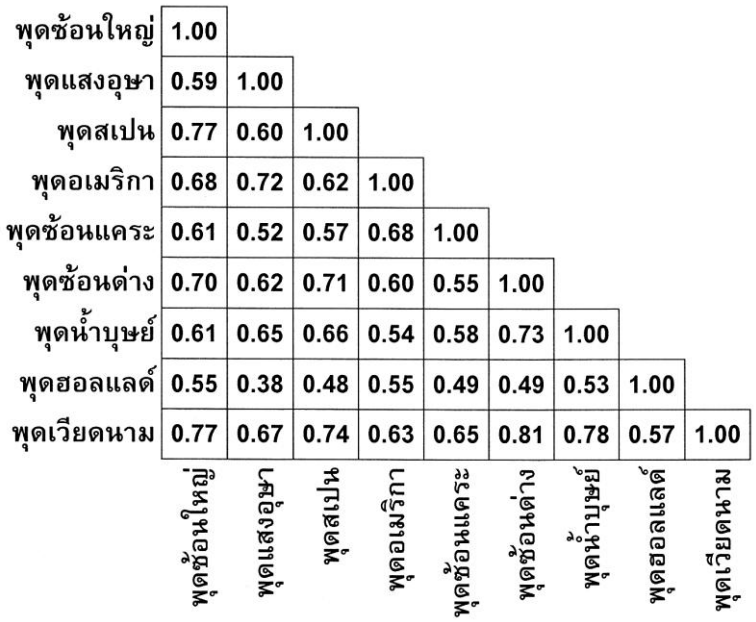
เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และแสดงผลในรูปแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) พบว่าพุดที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 9 พันธุ์ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 2) ได้แก่ กลุ่ม 1 คือ พุดซ้อนใหญ่ พุดซ้อนด่าง พุดเวียดนาม และพุดสเปน ซึ่งมีลำต้นทรงพุ่มและมีดอกสีขาวขนาดใหญ่ กลุ่ม 2 คือ พุดน้ำบุษย์ ซึ่งมีลำต้นสูงโปร่งและดอกบานวันแรกมีสีขาว ดอกบานวันที่ 2 มีสีเหลืองอ่อน และดอกบานวันที่ 3 มีสีเหลืองเข้ม กลุ่ม 3 คือ พุดแสงอุษาและพุดอเมริกา ซึ่งมีลำต้นสูงโปร่งและมีดอกสีขาวขนาดใหญ่ และกลุ่ม 4 คือ พุดซ้อนแคระและพุดฮอลแลนด์ ซึ่งมีลำต้นทรงพุ่มและมีดอกสีขาวขนาดใหญ่ที่มีกลีบดอกซ้อนมาก โดยทั้ง 4 กลุ่ม มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.81 เฉลี่ย 0.62 โดยกลุ่ม 1 ซึ่งประกอบด้วย



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ F25 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-9 คือ พุดซ้อนใหญ่ พุดแสงอุษา พุดสเปน พุดอเมริกา พุดซ้อนแคระ พุดซ้อนด่าง พุดน้ำบุษย์ พุดฮอลแลนด์ และพุดเวียดนาม ตามลาดับ]



ภาพที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของพุดสกุลการ์ดีเนียที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี



ภาพที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของพุดสกุลการ์ดีเนียที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี

พุด 4 พันธุ์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในกลุ่มอยู่ระหว่าง 0.70 ถึง 0.81 เฉลี่ย 0.75 (ภาพที่ 3)

เมื่อพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.50 พบว่ากลุ่มที่ 1 และ 4 ซึ่งเป็นพุดชนิดเดียวกันและมีลักษณะทางสันฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน เพราะเกิดจากการปรับปรุงพันธุ์พุดซ้อนใหญ่ด้วยการผสมพันธุ์และการฉายรังสี พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) สูงเช่นเดียวกับบทความวิจัยของ Han *et al*. (2007) บ่งชี้ว่าพุดชนิดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ภายในชนิดสูง โดยแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พุดซึ่งได้จากการวิจัยครั้งนี้ยังสามารถใช้เป็นเครื่องหมายอาร์เอพีดีสำหรับจำแนกพันธุ์พุดได้ และผลการวิจัยยังเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาวิจัยและการวางแผนอนุรักษ์ในอนาคต นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังแสดงถึงศักยภาพของเทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์พุดได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น พริก น้อยหน่า บัวหลวง (ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2543; นฤมล ธนานันต์ และมานะ ขาวเมฆ, 2549; ธีระชัย ธนานันต์, 2550)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ดีเนีย 9 พันธุ์ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าพุดมีความผันแปรทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยงานวิจัยนี้ตรวจพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกพุด 9 พันธุ์ ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว และเมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS พบว่าสามารถแบ่งพุดสกุลการ์ดีเนียที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็น 4 กลุ่ม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้บางส่วนได้รับการสนับสนุนจากกลุ่มวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส สกว.-สกอ. (ศาสตราจารย์ ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส และคณะ)

เอกสารอ้างอิง

ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2543). เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 8* (1), 6-10.

นฤมล ธนานันต์ และมานะ ขาวเมฆ. (2549). การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี. วารสาร*วิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ 1*(3), 15-23.

ธีระชัย ธนานันต์. (2550). การจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 15*(1), 9-15.

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. & Agrawal, V.P. (1992). Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. *Biotechnology and Biodiversity Letters, 2*, 19-24.

Bradshaw, J. (2003). *Gardenias*. Florida: University of Florida, Cooperative Extension Service, IFAS.

Han, J., Zhang, W., Cao, H., Chen, S. & Wang, Y. (2007). Genetic diversity and biogeography of the traditional Chinese medicine, *Gardenia jasminoides*, based on AFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology, 35*, 138-145.

Kobayashi, K.D. & Kaufman, A.J. (2006). *Common Gardenia*. Hawaii: University of Hawaii at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources, Cooperative Extension Service, OF-32.

Lee, P., Lee, J., Choi, S.Y., Lee, S.E., Lee, S. & Son, D. (2006). Geniposide from *Gardenia jasminoides* attenuates neuronal cell death in oxygen and glucose deprivation-exposed rat hippocampal slice culture. *Biological & Pharmaceutical Bulletin, 29*, 174-176.

Rohlf, F.J. (2002). *NTSYpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. New York: Applied Biostatistics, Inc.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Wilkie, S.E., Isaac, P.G. & Slater, R.J. (1993). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker for genetic analysis in Allium. *Theoretical and Applied Genetics, 86*, 476-504.