

การตรวจสอบข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

Detection of Genetically Modified Maize and Soybean Using Polymerase Chain Reaction

นคร สอนสมบุญ, ปาริยา ณ นคร และธีระชัย ธานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Nakorn Sornsomboon, Pariya Na Nakorn and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

พืชดัดแปลงพันธุกรรมมีการเพาะปลูกในหลายประเทศ ขณะเดียวกันในอีกหลายประเทศได้ห้ามเพาะปลูกและนำเข้า เพื่อป้องกันการปนเปื้อนพืชดัดแปลงพันธุกรรมในอาหาร จึงมีการตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยวิธีทางโปรตีนและดีเอ็นเอ งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยตรวจสอบตำแหน่งโปรโมเตอร์ 35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS พบว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรม 7 ตัวอย่าง จาก 15 ตัวอย่าง ตรวจพบเทอร์มิเนเตอร์ NOS มีเพียง 1 ตัวอย่าง เท่านั้นที่ตรวจพบทั้งโปรโมเตอร์ 35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS

คำสำคัญ : พืชดัดแปลงพันธุกรรม; ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์; โปรโมเตอร์ 35S; เทอร์มิเนเตอร์ NOS

Abstract

Genetically modified plants (GM plants) are cultivated in many countries, at the same time, it is prohibited for importing and cultivating from many countries. Protein and DNA detection methods are used for prevention of the contamination of GM plants in food products. This research used polymerase chain reaction (PCR) to detect 35S promoter and NOS terminator in maize and soybean.

In this research, NOS terminator was detected in seven samples and both 35S promoter and NOS terminator were detected in one sample.

Keywords: genetically modified plant; polymerase chain reaction; 35S promoter; NOS terminator

1. คำนำ

พืชตัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified plant) เป็นผลผลิตจากพันธุวิศวกรรมในพืช เพื่อให้พืชแสดงลักษณะที่ต้องการ เช่น ต้านทานแมลงศัตรูพืช วัชพืช ยากำจัดวัชพืช รวมไปถึงสภาวะการปลูกที่ไม่เอื้ออำนวย เช่น แล้ง โดยเสกสรร และโดม (2009) ได้รายงานว่ามีการพัฒนาพืชตัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นวัคซีนแบบรับประทาน

พืชตัดแปลงพันธุกรรมมีการปลูกอย่างแพร่หลายกว่า 28 ประเทศทั่วโลก และมีพื้นที่ปลูกรวมกันกว่า 181.5 ล้าน เฮกตาร์ (1 เฮกตาร์ = 10,000 ตารางเมตร) โดยพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่นิยมปลูก ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด ฝ้าย คาโนล่า เป็นต้น (James, 2014)

แม้ว่าจะมีการปลูกและจำหน่ายพืชตัดแปลงพันธุกรรมในหลายประเทศ อย่างไรก็ตาม ยังมีอีกหลายประเทศที่ไม่อนุญาตให้มีการปลูกและนำเข้าพืชตัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งรวมถึงประเทศไทย การหลุดรอดของพืชตัดแปลงพันธุกรรมเข้ามาในประเทศไทยนั้นมาจากการนำเข้าวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะข้าวโพด (*Zea mays*) และถั่วเหลือง (*Glycine max*) เพื่อเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมหลายอย่าง ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการส่งออกผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนจากวัตถุดิบที่เป็นพืชตัดแปลงพันธุกรรมนั้น (ประศาสน์, 2548)

การตรวจสอบพืชหรืออาหารดัดแปลงพันธุกรรม มี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน และระดับดีเอ็นเอ โดยการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอนิยมใช้

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction, PCR) เป็นหลัก (ชนิษฐา, 2548)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะตรวจสอบข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมจากตัวอย่างที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ ตรวจสอบบริเวณโปรโมเตอร์ 35S (35S promoter) และเทอร์มิเนเตอร์ NOS (NOS terminator)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเมล็ดข้าวโพด ผลัดกันจากข้าวโพดและถั่วเหลือง ซึ่งผ่านขั้นตอนการแปรรูปในกระบวนการผลิตที่ระดับต่างกัน แสดงดังตารางที่ 1 โดยตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดจะนำไปปลูกจนมีใบยาวประมาณ 12 เซนติเมตร แล้วจึงตัดเก็บ ตัวอย่างที่มีการปรุงรสจะแยกออกจากเนย นม และน้ำตาล โดยการร่อนผ่านตระแกรงตาถี่ หรือล้างด้วยดีเทอเจนท์ (detergent) แล้วนำไปอบให้แห้ง และตัวอย่างอ้างอิง คือ พลาสมีด pBI121 ที่มีโปรโมเตอร์ 35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ประกอบอยู่

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) แล้วตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (นคร และคณะ, 2556) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส

(agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบชั้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ โปรโมเตอร์ 35S และเทอร์มินเตอร์ NOS

ตรวจสอบชั้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *zein* ในข้าวโพด และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชั้นดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer) ในถั่วเหลือง รวมทั้ง

ตรวจสอบชั้นดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์ 35S และชั้นดีเอ็นเอบริเวณเทอร์มินเตอร์ NOS โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 2

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตร (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ไพรเมอร์ชนิดละ 0.25 ไมโครโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า ซึ่งมี dNTP 200 ไมโครโมลาร์ และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (Vivantis™ Technologies, Malaysia) 0.5 ยูนิต ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

ตารางที่ 1 ตัวอย่างและระดับการผ่านกระบวนการผลิต

หมายเลขตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ระดับการผ่านกระบวนการผลิต
1	ข้าวโพดดิบสำหรับทำข้าวโพดคั่ว	น้อย
2	ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	น้อย
3	ข้าวโพดดิบสำหรับทำข้าวโพดคั่ว	น้อย
4	ฝักข้าวโพดสด	ไม่ผ่าน
5	เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด	ไม่ผ่าน
6	เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด	ไม่ผ่าน
7	เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด	ไม่ผ่าน
8	เครื่องดื่มธัญญาหารสำเร็จรูป	มาก
9	เครื่องดื่มธัญญาหารสำเร็จรูป	มาก
10	ข้าวโพดดิบปรุงรสสำหรับทำข้าวโพดคั่วสำเร็จรูป	มาก
11	เครื่องดื่มธัญญาหารสำเร็จรูป	มาก
12	ผงแป้งถั่วเหลือง	น้อย
13	อาหารเสริมจากถั่วเหลือง	มาก
14	อาหารเสริมจากถั่วเหลือง	มาก
15	ผงแป้งข้าวโพด	น้อย

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สใช้อุณหภูมิเริ่มต้นในการคลายเกลียวที่ 94 °C นาน 5 นาที อุณหภูมิในการต่อสายดีเอ็นเอขั้นสุดท้ายที่ 72 °C นาน 3 นาที ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชั้นดีเอ็นเอเป้าหมายใช้อุณหภูมิในการคลายเกลียวที่ 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที และอุณหภูมิในการต่อสายดีเอ็นเอที่ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที ส่วนขั้นตอน

การเข้าจับกับตำแหน่งเป้าหมายของไพรเมอร์ใช้อุณหภูมิต่างกัน โดยไพรเมอร์สำหรับยีน *zein* ใช้ 59 °C ไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง ITS ใช้ 55 °C ไพรเมอร์สำหรับบริเวณโปรโมเตอร์ 35S ใช้ 54 °C และไพรเมอร์สำหรับเทอร์มินเตอร์ NOS ใช้ 62 °C ซึ่งใช้เวลาเท่ากัน คือ 45 วินาที

เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สเสร็จแล้ว

นำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของตำแหน่งเป้าหมายไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) และวิเคราะห์ผลการวิจัยต่อไป

ตารางที่ 2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการวิจัย

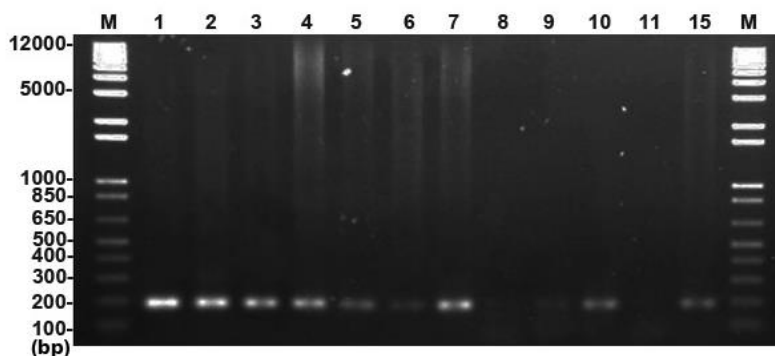
ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทป์ (5'→3')	อ้างอิง
Zein-F	GGGCTTGCCAGCTTGATGG	นคร และคณะ (2556)
Zein-R	GTCGCAGTGACATTGTGGCAT	Quist และ Chapela (2001)
ITS-F	GTAACAAGGTTTCCGTAGGT	ดัดแปลงจาก Tsai และคณะ (2004)
ITS-R	GTAAGTTTCTTCTCCTCCGCT	Tsai และคณะ (2004)
35S-F	GCTCCTACAAATGCCATCA	Zaulet และคณะ (2009)
35S-R	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	Zaulet และคณะ (2009)
NOS-F	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG	Zaulet และคณะ (2009)
NOS-R	GACACCGCGCGCGATAATTTATCC	Zaulet และคณะ (2009)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ

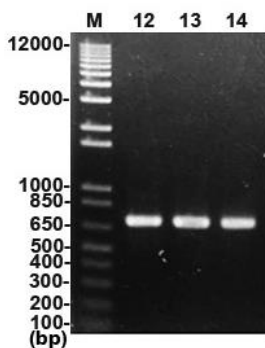
การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของตำแหน่งจำเพาะเพื่อเป็นการยืนยันถึงปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอว่าเพียงพอต่อการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ 12 จาก 15 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ โดยตัวอย่างข้าวโพดที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ

ของยีน *zein* ขนาดประมาณ 198 คู่เบส (bp) มี 9 จาก 12 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 และ 15 (รูปที่ 1) ส่วนตัวอย่างถั่วเหลืองทั้ง 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 12, 13 และ 14 สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS ขนาดประมาณ 700 คู่เบส ได้ทั้งหมด (รูปที่ 2) โดยชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS จะมีขนาดต่างกันไปในแต่ละสิ่งมีชีวิต เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งนี้มีความผันแปรในแต่ละสิ่งมีชีวิต (Baldwin *et al.*, 1995)



รูปที่ 1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *zein* ในตัวอย่างข้าวโพด

[M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA); หมายเลข 1-11 และ 15 คือ หมายเลขตัวอย่างข้าวโพด (ตารางที่ 1)]



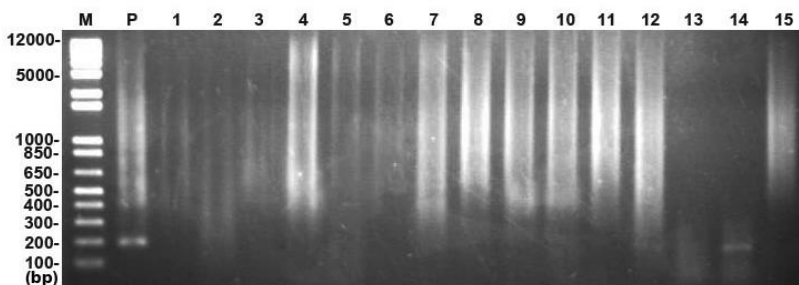
รูปที่ 2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS ในตัวอย่างถั่วเหลือง [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA); หมายเลข 12, 13 และ 14 คือ หมายเลขตัวอย่างถั่วเหลือง (ตารางที่ 1)]

ตัวอย่างที่ 8, 9 และ 11 ของข้าวโพดที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *zein* อาจเกิดจากขั้นตอนการผลิตได้ผ่านกระบวนการแปรรูปทางอาหาร โดย

ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหารเป็นปัจจัยหนึ่งในการทำให้เกิดความเสียหายของสารพันธุกรรม (Bauer *et al.*, 2003) และอาจเกิดจากการมีส่วนประกอบอื่น ๆ เจือปนในตัวอย่างมาก ทำให้ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (นฤมล และคณะ, 2553)

3.2 การตรวจสอบตัวอย่างข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์ 35S และเทอร์มินเตอร์ NOS ปรากฏว่ามีตัวอย่างที่ 14 เพียงตัวอย่างเดียวที่พบแถบดีเอ็นเอของโปรโมเตอร์ 35S ขนาดประมาณ 195 คู่เบส (รูปที่ 3) และมี 7 ตัวอย่าง ที่พบแถบดีเอ็นเอของเทอร์มินเตอร์ NOS ขนาดประมาณ 118 คู่เบส ได้แก่ ตัวอย่างที่ 10, 11, 12 14 และ 15 ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ส่วนตัวอย่างที่ 9 และ 13 ให้แถบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างจาง (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์ 35S ในตัวอย่างข้าวโพดและถั่วเหลือง

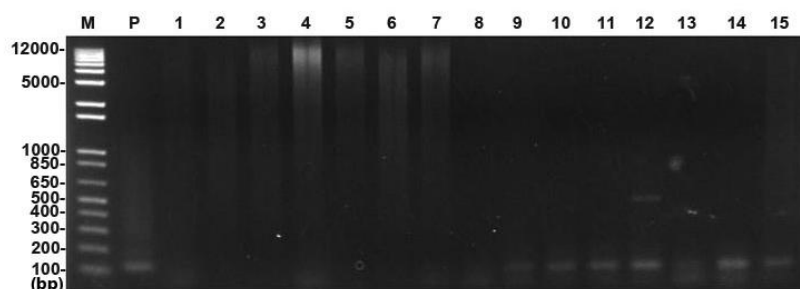
[M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA); หมายเลข 1-15 คือ หมายเลขตัวอย่างข้าวโพดและถั่วเหลือง (ตารางที่ 1)]

เมื่อพิจารณาการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอทั้งของบริเวณโปรโมเตอร์ 35S และเทอร์มินเตอร์ NOS เปรียบเทียบกัน ปรากฏว่ามีตัวอย่างที่ 14 ซึ่งเป็นอาหารเสริมจากถั่วเหลืองเพียงตัวอย่างเดียวที่พบแถบดีเอ็นเอของทั้งสองบริเวณดังกล่าว โดยตัวอย่างส่วนใหญ่ตรวจพบเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอของ

บริเวณเทอร์มินเตอร์ NOS และไม่พบชิ้นดีเอ็นเอของบริเวณโปรโมเตอร์ 35S เนื่องจากการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจใช้โปรโมเตอร์ชนิดอื่น ๆ ร่วมกับเทอร์มินเตอร์ NOS ตัวอย่าง เช่น การตรวจสอบในข้าวโพด อีเวนท์ GA 21 และอีเวนท์ MIR 604 (Waiblinger *et al.*, 2010) ตรวจไม่พบ

โปรโมเตอร์ 35S แต่พบเทอร์มิเนเตอร์ NOS อีกสาเหตุหนึ่งที่เป็นไปได้คือ ชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายของบริเวณเทอร์มิเนเตอร์ NOS มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้นกว่าชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายของบริเวณโปรโมเตอร์ 35S เกือบเท่าตัว ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้นกว่าย่อมมีโอกาสเกิดการแตกหักเสียหายของสายดีเอ็นเอจากสาเหตุต่าง ๆ (เช่น การแปรรูปผลิตภัณฑ์ การสกัดดีเอ็นเอ) ได้น้อยกว่า

ดังนั้นจึงทำให้การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของบริเวณเทอร์มิเนเตอร์ NOS มีประสิทธิภาพสูงกว่าโดยข้อสันนิษฐานนี้สามารถอธิบายการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ 9 และ 11 ซึ่งตรวจพบแถบดีเอ็นเอของบริเวณเทอร์มิเนเตอร์ NOS แต่ไม่พบทั้งแถบดีเอ็นเอของยีน *zein* และแถบดีเอ็นเอของบริเวณโปรโมเตอร์ 35S



รูปที่ 4 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณเทอร์มิเนเตอร์ NOS ในตัวอย่างข้าวโพดและถั่วเหลือง

[M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA); หมายเลข 1-15 คือ หมายเลขตัวอย่างข้าวโพดและถั่วเหลือง (ตารางที่ 1)]

4. สรุป

ตัวอย่างข้าวโพดและถั่วเหลือง 15 ตัวอย่างสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของตำแหน่งจำเพาะได้ 12 ตัวอย่าง และมีเพียง 7 ตัวอย่าง ที่เป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรมเมื่อตรวจสอบด้วยเทอร์มิเนเตอร์ NOS โดยพบเพียงตัวอย่างที่ 14 เท่านั้นที่ตรวจพบทั้งโปรโมเตอร์ 35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ประจำปีงบประมาณ 2556 เลขที่สัญญาฉบับที่ ทน 26/2556 และขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต สำหรับการอนุญาตให้ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์บางอย่าง

6. รายการอ้างอิง

- ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, 2548, การตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรม, เอกสารวิชาการ, กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาทางเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- นคร สอนสมบุรณ์, ปาริยา ณ นคร, ชีระชัย ธนา นันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การตรวจสอบข้าวโพดและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์, Thai J. Genet. S(1): 253-257.
- นฤมล ธนานันต์, หทัยรัตน์ แสงดวง และชีระชัย ธนานันต์, 2553, การใช้เทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์ตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกบางชนิดในโยเกิร์ต, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 18(3):

- 19-24.
- ประกาศตร์ เกื้อมณี, 2548, GMOs : ชีวิตที่ถูกดัดแปรพันธุกรรม, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- เสกสรร ชินวัง และโดม หาญพิชิตวิทยา, 2009, การใช้พืชดัดแปลงพันธุกรรมในทางการแพทย์ : วัคซีนกินได้, Rajabhat Agric. 8(2): 59-65.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. and Donoghue, M.J., 1995, The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny, Ann. Missouri Bot. Gard. 82: 247-277.
- Bauer, T., Weller, P., Hammes, W.P. and Hertel, C., 2003, The effect of processing parameters on DNA degradation in food, Food Res. Technol. 217: 338-343.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- James, C., 2014, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops, Brief 49, ISAAA SEAsiaCenter, c/o IRRI, Metro Manila, Philippines.
- Quist, D. and Chapela, I.H., 2001, Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico, Nature 414: 541-543.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Tsai, C.C., Peng, C.I., Huang, S.C., Huang, P.L. and Chou, C.H., 2004, Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA, Sci. Hort. 101: 315-325.
- Waiblinger, H.U., Grohmann, L., Mankertz, J., Engelbert, D. and Pietsch, K., 2010, A practical approach to screen for authorised and unauthorised genetically modified plants, Anal. Bioanal. Chem. 396: 2065-2072.
- Zaulet, M., Rusu, L., Kevorkian, S., Luca, C., Mihacea, S., Badea, E.M. and Costeche, M., 2009, Detection and quantification of GMO and sequencing of the DNA amplified products, Rom. Biotechnol. Lett. 14(5): 4733-4746.