

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย วิจัยการปรับปรุงพันธุ์อัญชัน (โครงการวิจัยเดี่ยว)
 2. โครงการวิจัย วิจัยการปรับปรุงพันธุ์อัญชัน
 3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การคัดเลือกอัญชันสายพันธุ์ลูกผสม¹
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Selection of Hybrid Line Butterfly Pea (*Clitoria tematea* L.)
 4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายจรูญ ดิษฐไชยวงศ์	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
ผู้ร่วมงาน	นางสาวเกษร แซ่มชื่น	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร
	นายพินิจ เขียวพุ่มพวง	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร
	นางสาวศรีสุตา ไท้ทอง	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
 5. บทคัดย่อ : อัญชันพันธุ์ปลูกทั่วไป มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม เนื่องจากในธรรมชาติมีการผสมข้ามโดยแมลง ทำให้ผลผลิต ลักษณะดอก และคุณสมบัติทางเคมีอาจไม่คงที่ เพื่อให้ได้อัญชันสายพันธุ์ลูกผสมให้ผลผลิตและปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าพันธุ์ปลูกทั่วไป ใช้วิธีคัดเลือกแบบบันทึกประวัติ ปี 2561-2562 ปลูกคัดเลือกสายพันธุ์ชั่วที่ 2 -ชั่วที่ 3 ของกลุ่มผสม (7-1-16 ×13) ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอ โดยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) และวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินในดอกสด ที่ศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 3 ได้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ (7-1-16 ×13) -33-2, (7-1-16 ×13) -33-3, (7-1-16 ×13) -33-4 และ (7-1-16 ×13) -33-5 ให้ผลผลิตดอกสด 3.022, 3.165, 3.559 และ 3.408 กิโลกรัมต่อต้น ตามลำดับ และให้ปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่ากำหนดมาตรฐานคัดเลือก คือ มีปริมาณแอนโทไซยานินไม่น้อยกว่า 70 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักกลีบดอกสด 100 กรัม เก็บเมล็ดชั่วที่ 4 ปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ในปี 2563
- คำหลัก : อัญชัน สายพันธุ์ ผลผลิต แอนโทไซยานิน

¹ รหัสการทดลอง 02-159-61-01-00-00-01-61

ABSTRACT

Common cultivars of butterfly pea have genetic diversity because in natural hybridization were out crossing by insects. Therefore yields as well as flower characteristics and physiochemical properties should not stable. This research aims to find hybrid lines of butterfly pea for high flower yield and high total anthocyanin weight than common cultivar. In 2018-2019, the 2nd and 3rd filial generation (F_2 - F_3) of the hybrid (7-1-16 × 13) butterfly pea was grown and selected by using pedigree method at Pichit Agricultural Research and Development Center. The genetic diversity of F_2 - F_3 lines was investigated by using Random amplified polymorphic DNA (RAPD) techniques and analysis anthocyanin contents were done at Science and Technology Service Center, Chiang Mai University. Results showed that the F_3 lines; line numbers (7-1-16 × 13) -33-2, (7-1-16 × 13) -33-3, (7-1-16 × 13) -33-4 and (7-1-16 × 13) -33-5 gave the fresh flower yields of 3.022, 3.165, 3.559 and 3.408 kilogram per plant, respectively. The anthocyanin contents of these lines was more than the standard set as anthocyanin level of not less than 70 milligram per 100 gram of fresh petal. The F_4 seeds of selected lines will be used for varietal trials in 2020.

Key words : butterfly pea, line, yield, anthocyanin

6. คำนำ: กล้วยชัน (butterfly pea, blue pea) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Clitoria ternatea* L. พืชวงศ์ถั่ว (Fabaceae) เป็นพืชล้มลุก สีของดอกมีทั้งชนิดดอกสีขาวและดอกสีน้ำเงิน กลีบดอกมีทั้งชนิดชั้นเดียวและดอกซ้อน ออกดอกเกือบตลอดปี โดยทั่วไปมักนึกถึงกล้วยชันดอกสีน้ำเงิน ซึ่งมีสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) มักพบการใช้ประโยชน์ของดอกกล้วยชันเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบางชนิด และใช้สีจากดอกเป็นส่วนผสมในขนมและอาหาร หรือใช้ดอกแห้งชงเป็นเครื่องดื่ม ดอกนำมาทำเป็นยาพอก หรือคั้นน้ำมาใช้ทาแก้ฟกบวม แก้พิษแมลงกัดต่อย และใช้สระผมเป็นยาแก้ผมร่วง (พิชานันท์, 2557) กล้วยชันเป็นพืชที่มีการผสมตัวเอง แต่ในธรรมชาติมีการผสมข้ามสายพันธุ์ (out crossing) จึงมีการกระจายตัวทางพันธุกรรม ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของ สายพันธุ์ (Anonymous, 2016; Moris, 2009) ความแปรปรวนของสีดอกที่พบมีตั้งแต่สีขาว สีขาวปนน้ำเงิน สีน้ำเงินอ่อน สีน้ำเงินเข้ม และสีม่วง (Moris, 2009) การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมตัวเอง นิยมใช้การคัดเลือกพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) ใน

ประชากรของพืชผสมตัวเองที่ไม่มีการผสม สายพันธุ์พืชเกือบทั้งหมดของประชากรจะประกอบด้วยสายพันธุ์แท้ที่หลากหลาย ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามหรือกลายพันธุ์ โดยธรรมชาติพันธุ์กลายเหล่านี้ เมื่อถูกคัดเลือกและการปลูกซ้ำ ๆ เป็นเวลานาน จะเข้าสู่สภาพคงตัวทางพันธุกรรมในที่สุด และเกิดพันธุ์แท้ปะปนอยู่ในประชากร (กฤษฎา, 2546) การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมตัวเอง จึงเน้นไปที่การปรับปรุงสายพันธุ์แท้ เพื่อนำไปใช้โดยตรงหรือผลิตพันธุ์ลูกผสม เมื่อมีระบบการผสมข้ามพันธุ์ที่เหมาะสม (กฤษฎา, 2546) ประชากรอัญชันพันธุ์ปลูกทั่วไป (common cultivar) มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ความแปรปรวนที่พบ ได้แก่ ลักษณะดอก มีกลีบดอกตั้งแต่ 3-5 กลีบ ปะปนในต้นเดียวกัน ได้ผลผลิตไม่สม่ำเสมอ ปี 2554-2557 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร ทำการปรับปรุงพันธุ์อัญชัน โดยนำเมล็ดอัญชันพันธุ์ปลูกทั่วไป (common cultivar) ซึ่งมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม มาปลูกคัดเลือกสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอ พบว่า มีความคงตัวทางพันธุกรรม และมีความสม่ำเสมอของพันธุ์ คัดเลือกได้อัญชันสายพันธุ์แท้ (inbred line) ปี 2559 ทำการผสมข้ามสายพันธุ์แท้ 2 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ในแต่ละชั่ว (filial generation) ใช้วิธีการคัดเลือกแบบบันทึกประวัติ (pedigree method) คัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีที่สุดในแต่ละชั่วหรือดีกว่ามาตรฐาน ปี 2561-2562 ปลูกคัดเลือกชั่วที่ 2 (F_2) ได้เมล็ดชั่วที่ 3 (F_3) และปี 2562 ปลูกคัดเลือกชั่วที่ 3 (F_3) เพื่อให้ได้เมล็ดชั่วที่ 4 (F_4) อย่างน้อย 3 สายพันธุ์ ใช้ปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์ปลูกทั่วไป ในปี 2563

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เมล็ดอัญชันชนิดดอกสีน้ำเงิน สายพันธุ์ F_2
2. ไม้ค้ำ ปุ๋ยคอก เชือกพลาสติก สารฆ่าแมลง เดลตาเมทริน (deltamethrin)
3. มุ้งไนลอนทรงสี่เหลี่ยมขนาดกว้าง 1.50 เมตร ยาว 1.50 เมตร และสูง 2.50 เมตร
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า และป้ายแปลง

- วิธีการ

1. ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์

ปลูกและคัดเลือกสายพันธุ์อัญชันแบบบันทึกประวัติ กำหนดมาตรฐานการคัดเลือกพันธุ์อัญชัน คือ ดอกสีน้ำเงินเข้ม กลีบดอก 5 กลีบ ช่อนเวียน เก็บผลผลิตอย่างน้อย 45 ครั้ง ให้น้ำหนักดอกสดไม่น้อยกว่า 1 กิโลกรัมต่อต้นหรือ 1,600 กิโลกรัมต่อไร่ และมีปริมาณแอนโทไซยานินไม่น้อยกว่า 70 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักกลีบดอกสด 100 กรัม ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์อัญชัน ดังนี้ (Figure 1)

ปี 2559 ปลูกสายพันธุ์พ่อแม่ วันที่ 18 ธันวาคม 2558 ผสมข้ามพันธุ์ เก็บเมล็ด ได้เมล็ด F_1 และ ปลูก F_1 8 ต้น วันที่ 8 มิถุนายน 2559 เก็บเมล็ด F_2

ปี 2561 ปลูก F_2 200 ต้น วันที่ 23 มกราคม 2561 เก็บเกี่ยวผลผลิตตั้งแต่วันที่ 5 มีนาคม – 9 พฤษภาคม 2561 คัดเลือกต้นเดี่ยว (single plant) ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดแยกต้น ได้เมล็ด F_3

ปี 2562 ปลูก F_3 6 ต้น เมื่อวันที่ 29 ตุลาคม 2561 คัดเลือกต้น ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดแยกต้น ได้เมล็ด F_4 4 สายพันธุ์

ปี 2563 ปลูกเปรียบเทียบ F_4 3 สายพันธุ์กับพันธุ์ปลูกทั่วไปของเกษตรกร 1 พันธุ์ ในศูนย์วิจัย และพัฒนาการเกษตรพิจิตร และแปลงเกษตรกร จังหวัดสุโขทัย

ปี 2564 เสนอเพื่อพิจารณาเป็นพันธุ์แนะนำ 1 สายพันธุ์

Year	Butterfly pea breeding procedure	Location /number of plot ^{1/}
2016	Line no. 7-1-16 × Line no. 13 ↓ cross 2 parental lines, harvest F_1 seeds. F_1 grow F_1 8 plants, ⊗ self , harvest F_2 seeds,	PARDC (1) PARDC (1))
2018	F_2 grow F_2 200 plants, ↓ ⊗ self, harvest F_3 seeds	PARDC (1)
2019	F_3 grow t F_3 6 plants, ↓ ⊗ self, harvest F_4 seeds	PARDC (1)
2020	Varietal trials of F_4 3 lines + 1 common cultivar ↓	1. PARDC (1) 2. FFS (1)
2021	Propose for consideration as a new varietal recommendation	Note: ^{1/} The number in parentheses indicate the number of plot.

Figure 1 Flowchart butterfly pea breeding procedure.

PARDC = Pichit Agricultural Research and Development Center.

FFS = Farm of farmer, Sukhothai province.

2. การปลูกและดูแลรักษา

เตรียมกล้า โดยแช่เมล็ดในน้ำสะอาดทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง นำเมล็ดขึ้นมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม เพาะเมล็ดในถาดหลุมที่มีดินพรุ (peat) เป็นวัสดุเพาะ ดูแลรักษาจนกระทั่งกล้ามีใบจริง 2 ใบ จึงย้ายปลูก ขนาดแปลงกว้าง 4 เมตร ยาว 4 เมตร สูง 20 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างแปลง 1 เมตร ปรับผิวแปลงให้สม่ำเสมอ ปลูกแบบแถวเดี่ยว ระยะห่างระหว่างต้น 2 เมตร ระหว่างแถว 2 เมตร ขุดหลุมปลูกขนาด 15 × 15 × 15 เซนติเมตร รองพื้นก่อนปลูกด้วยปุ๋ยคอกอัตรา 300 กรัมต่อหลุม ปลูก 1 ต้นต่อหลุม ย้ายกล้าวางที่ก้นหลุมให้ลึกประมาณ 5 เซนติเมตร กลบดินที่เหลือลงในหลุม กดดินบริเวณโคนต้นพอแน่น ให้น้ำตั้งแต่ปลูกถึงเก็บเกี่ยว ปริมาณน้ำที่ให้สังเกตดินในแปลงเปียกชื้น และเล็กน้อยจึงหยุดให้ กำจัดวัชพืชหลังปลูกเดือนละครั้ง ใส่ปุ๋ยคอกอัตรา 300 กรัมต่อต้น หลังปลูกเดือนละครั้ง ใช้สารเคลือบเมทริล อัตรา 5-10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ฟันป้องกันกำจัดหนอนเจาะดอกและฝัก เมื่อพบดอกและฝักถูกทำลาย 10 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนต้นทั้งหมด

3. การเก็บเกี่ยว

ทยอยเก็บผลผลิตทุกวัน เก็บดอกสดตอนเช้า ลักษณะดอกเริ่มบาน ชั่งน้ำหนักดอกสด

4. จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมาย

เก็บตัวอย่างใบอายุต้นที่ผ่านการคัดเลือก F₂ 5 ต้น F₃ 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์พ่อแม่ คือ สายพันธุ์ 7-1-16 และสายพันธุ์ 13 ส่งวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอ โดยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Doyle and Doyle, 1987; Shinde *et al.*, 2007; Devaiah and Venkatasubramanian, 2008)

5. คุณสมบัติทางเคมี

เก็บตัวอย่างดอกสดอายุต้นที่ผ่านการคัดเลือก ส่งวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน โดยดัดแปลงจาก estimation of total anthocyanin method ของ Ranganna (1977)

การบันทึกข้อมูล

อายุเก็บเกี่ยวเมื่อออกดอก 50 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตดอกสด และปริมาณแอนโทไซยานินรวม เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ปี 2561 สิ้นสุด ปี 2562

สถานที่

1. แปลงทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร
2. ห้องปฏิบัติการ ศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ผลผลิตและปริมาณแอนโทไซยานินของอัญชัน F₂

คัดเลือกต้นเดี่ยว อัญชัน F₂ ตามมาตรฐานกำหนด ได้ 4 ต้น ได้แก่ ต้น 10, 18, 26 และ 33 ให้ผลผลิตดอกสด 2.790, 2.838, 2.628 และ 3.136 กิโลกรัมต่อต้น ตามลำดับ และให้ปริมาณแอนโทไซยานินรวม 71.84, 72.35, 74.95 และ 73.57 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักกลีบดอกสด 100 กรัมตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Flower yield and total anthocyanin of butterfly pea F₂ at Phichit Agricultural Research and Development Center 2018.

Filial Generation	Plant no.	Fresh flower yield (kg/plant) ^{1/}	Total anthocyanin (mg/100 g fresh petal)
F ₂	10	2.790	71.84
	18	2.838	72.35
	26	2.628	74.95
	33	3.136	73.57

^{1/} Fresh flowers were harvested 45 times.

8.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของอัญชัน F₂

แบ่งอัญชัน F₂ ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ F₂ ต้น 10 (F₂-10) ต้น 18 (F₂-18) และต้น 26 (F₂-26) ทั้ง 3 ต้น มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ 7-1-16 ส่วนกลุ่ม 2 คือ F₂ ต้น 10 (F₂-33) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับอัญชันสายพันธุ์ 13 (Figure 2)

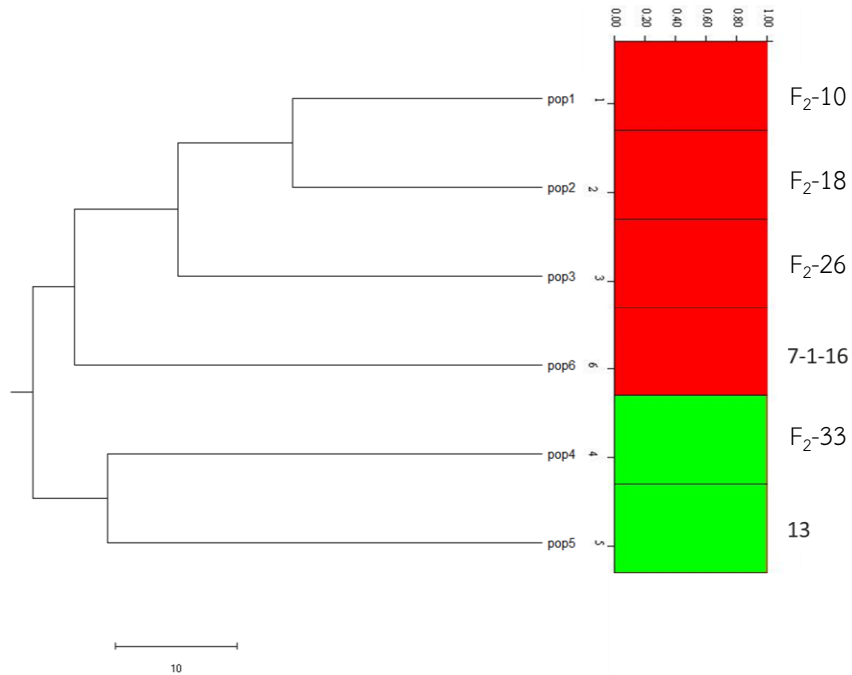


Figure 2 Genetic relationship of butterfly pea F_2 and their parent.

8.3 ผลผลิตและปริมาณแอนโทไซยานินของอัญชัน F_3

คัดเลือกต้น F_2 -33 ผสมตัวเอง ติดเมล็ด (F_3) น้อยมาก ปลูก F_3 ได้ 6 ต้น (สายพันธุ์) เก็บผลผลิตแยกต้น ได้สายพันธุ์ให้ผลผลิตสูง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ (7-1-16 × 13) -33-2, (7-1-16 × 13) -33-3, (7-1-16 × 13) -33-4 และ (7-1-16 × 13) -33-5 ให้ผลผลิตดอกสด 3.022, 3.165, 3.559 และ 3.408 กิโลกรัมต่อต้น ตามลำดับ ทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังกล่าว ให้ปริมาณแอนโทไซยานิน เมื่อเก็บเกี่ยวผลผลิต ถูกล้าง และถนอม มากกว่ากำหนดมาตรฐานการคัดเลือก

Table 3 Flower yield and total anthocyanin of butterfly pea F_3 at Pichit Agricultural Research and Development Center 2019.

Line number	Fresh flower yield (kg/plant) ^{1/}	Total anthocyanin (mg/100 g fresh petal)	
		Dry season	Rainy season
(7-1-16 ×13) -33-1	2.895	64.16	78.90
(7-1-16 ×13) -33-2	3.022	75.82	84.62
(7-1-16 ×13) -33-3	3.165	80.35	91.60
(7-1-16 ×13) -33-4	3.559	73.73	87.90
(7-1-16 ×13) -33-5	3.408	75.56	81.48
(7-1-16 ×13) -33-6	2.833	70.42	86.07

^{1/}Fresh flowers were harvested 45 times.

8.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอัญชัน F_3

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างใบของอัญชัน F_3 ด้วยเทคนิค RAPD ด้วย MATLAB แบบ Euclidean distance เมื่อพิจารณาข้อมูลที่ค่า 0.02 สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 มี 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ (7-1-16 × 13)-33-1 กลุ่ม 2 มี 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ (7-1-16 × 13)-33-2, (7-1-16 × 13)-33-3, (7-1-16 × 13)-33-6, 7-1-16 (7), #13 (8) กลุ่ม 3 มี 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ (7-1-16 × 13)-33-4 และ (7-1-16 × 13)-33-5 (Figure 3)

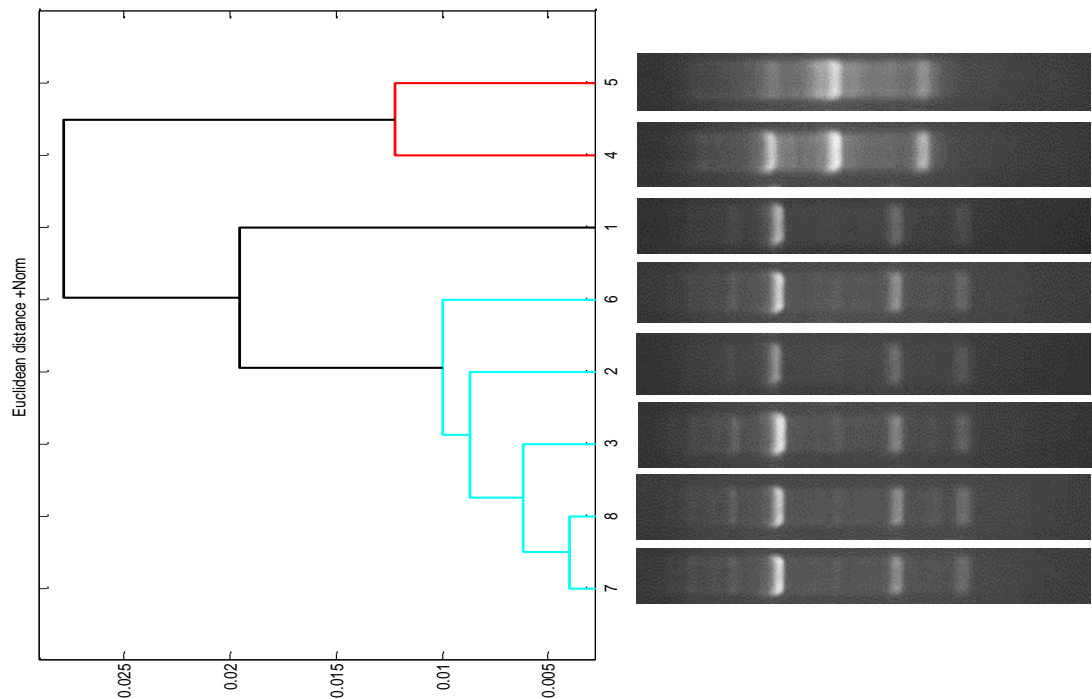


Figure 3 Phylogenetic tree analysis to show the genetic diversity of 8 butterfly pea using MATLAB program. Group 1; line no. (7-1-16 × 13) -33-1 (black line); group 2 has 5 lines were line no. (7-1-16 × 13) -33-2, (7-1-16 × 13) -33-3, (7-1-16 × 13) -33-6, 7-1-16 (7) and # 13 (8) (blue line); group 3 has 2 line were line no. (7-1-16 × 13) -33-4 and (7-1-16 × 13) -33-5 (red line). For example, agarose gel electrophoresis when using S24 primer (right hand).

9. **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ** : คัดเลือกอัญชันสายพันธุ์ลูกผสม F_3 ได้ 4 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตและปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่ากำหนดมาตรฐานการคัดเลือก เกือบเมล็ด F_4
10. **การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์** : นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ไปปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์ปลูกทั่วไปของเกษตรกร ในปี 2563
11. **คำขอบคุณ**

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชณี แสงทอง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ช่วยรับวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอของสายพันธุ์อัญชัน

12. เอกสารอ้างอิง

- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2546. ปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 237 หน้า
- พิชานันท์ สีแก้ว. 2557. อัญชัน. *จุลสารข้อมูลสมุนไพร* 32 (1): 10-17.
- Anonymous. 2016. *Clitoria ternatea*. Tropical Forages. Available: http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Clitoria_ternatea.htm [9 June 2016].
- Devaiah K.M. and P. Venkatasubramanian. 2008. Genetic characterization and authentication of *Embelia ribes* using RAPD-PCR and SCAR marker. *Planta Med.* 74(2):194-196. doi: 10.1055/s-2008-1034279.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation Procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Moris, J.B. 2009. Characterization of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) accessions for morphology, phenology, reproduction and potential nutraceutical, pharmaceutical trait utilization. *Genet Resour Crop Evol.* 56: 421-427.
- Ranganna, S. 1977. Plant Pigment. In Ranganna S. (Ed.), *Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products*, TaTa McGraw-Hill publishing Co., Ltd. New Delhi. p. 72-93.
- Shinde, V. M., K. Dhalwal, K. R. Mahadik, K. S. Joshi, and B. K. Patwardhan. 2007. RAPD Analysis for Determination of Components in Herbal Medicine Evid Based Complement *Alternat Med.* 4(Suppl 1): 21-23.

.....