

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์สบู่ดำในเอเชียจากการประเมิน
โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD
Genetic Diversity in Asian Physic Nuts as Evaluated by RAPD Markers

พัชรินทร์ ตัญญา^{1/}

สมบัติ ชินะวงศ์^{1/}

Patcharin Tanya^{1/}

Sombat Chinawong^{1/}

สนธิชัย จันท์เปรม^{1/}

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์^{1/}

Sontichai Chanprame^{1/}

Peerasak Srinives^{1/}

ABSTRACT

Physic nut or jatropha nut (*Jatropha curcas* L.) is a potential source of renewable energy as biodiesel and green fuel. A major problem of this crop is the lack of improved varieties for commercial plantation. To start a breeding project for physic nut, its genetic diversity should be studied to assess the genetic variation available for developing a new variety. Genetic variation studies were among 34 accessions of physic nut germplasm, collected from China, India, Vietnam and Thailand, using 37 RAPD markers. Eight markers showed polymorphism among the physic nut samples. The number of bands per primer ranged from 1 to 4, with an average of 1.75 alleles. A truncation of clustering at the Dice's similarity coefficient of 0.45 separated the genotypes into 2 groups. The first group comprised the materials from China and Vietnam, the second one comprised those from Thailand and India. A high cophenetic correlation (r) of 0.92 confirmed a good clustering result. These data can be used as a basic information for selection of parental plants for a jatropha nut breeding program.

Key words : *Jatropha curcas*, physic nut, jatropha nut, genetic diversity, RAPD markers

^{1/} ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

^{1/} Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom province 73140

บทคัดย่อ

สบู่ดำเป็นพืชหนึ่งที่มีศักยภาพเป็นพลังงานทดแทนทั้งในแง่น้ำมันและเชื้อเพลิง แต่ยังคงขาดพันธุ์ดีที่จะนำมาใช้ส่งเสริมเพื่อผลิตเป็นการค้า จึงต้องมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ เพื่อใช้สร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมและพัฒนาหาพันธุ์ใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) จำนวน 37 ไพรเมอร์ พบว่ามี 8 ไพรเมอร์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในตัวอย่างสบู่ดำ 34 ตัวอย่างจาก 4 ประเทศ คือ จีน อินเดีย เวียดนามและไทย ทั้งจากต้นที่ปลูกจากเมล็ดและท่อนพันธุ์ โดยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่างมีจำนวน 1-4 อัลลีล/ไพรเมอร์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ 1.75 และเมื่อแบ่งกลุ่มพันธุ์โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient 0.45 สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มไทยกับอินเดีย และกลุ่มจีนกับเวียดนาม ผลจากการจัดกลุ่มดังกล่าวได้ค่า cophenetic correlation (r) 0.92 แสดงว่าจัดกลุ่มได้ในเกณฑ์ดี ผลจากการศึกษาครั้งนี้ สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการวางแผนคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำในอนาคต

คำหลัก: *Jatropha curcas* สบู่ดำ ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD

คำนำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชที่มีดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious plant) มีแหล่งกำเนิดแถบประเทศเม็กซิโกและอเมริกากลาง จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับมันสำปะหลัง ยางพาราและละหุ่ง มีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทย ภาคเหนือเรียกว่ามะหุ้งฮั่ว ภาคใต้เรียกว่ามะเคาะ หรือหงส์เทศ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่ามะเยา หรือสีหลอด แต่ชื่อที่รู้จักกันโดยทั่วไป คือ สบู่ดำ ส่วนชื่อภาษาอังกฤษคือ physic nut, jatropha nut, purge nut, pig nut, fig nut และ jatropha (สมบัติ, 2549) นอกจากนี้ ยังมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น ประเทศเม็กซิโกเรียก pinoncillo เยอรมันเรียก purgiernuss โปรตุเกสเรียก purgueira เป็นต้น โดยชื่อสกุลของสบู่ดำที่เรียกว่า *Jatropha* นั้น มีความหมายจากภาษากรีก jatrós แปลว่า doctor และ trophé แปลว่า food ซึ่งมีความหมายโดยรวมว่า medicinal uses (Heller, 1996) สบู่ดำเป็นพืชที่ทนแล้ง การแผ่ของกิ่งก้านเหมาะที่จะปลูกเป็นรั้วบ้าน ส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำใช้เป็นยาสำหรับมนุษย์และสัตว์ สกัดน้ำมันเพื่อใช้บำรุงผิวพรรณ เป็นสารฆ่าแมลง น้ำมันสบู่ดำเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง น้ำมันหล่อลื่นและหมึกพิมพ์ ต้นและส่วนต่างๆ ของสบู่ดำยังใช้ทำปุ๋ยพืชสดได้ดีอีกด้วย (ประโยชน์, 2549)

ในบางประเทศ อาทิ ประเทศเม็กซิโก มีการนำเมล็ดสบู่ดำจากพันธุ์ที่ไม่มีสารพิษมาคั่ว

เพื่อบริโภค โดยมีแหล่งปลูกอยู่แถวหมู่บ้าน Papantla เมือง Veracruz คาบสมุทร Yucatan มีชื่อเรียกเฉพาะเป็นภาษาชนเผ่า Mayas ว่า sikil-té ซึ่ง Makkar และคณะ (1998a) พบว่า พันธุ์เหล่านี้ปลอดภัยจากสารพิษที่สำคัญ 2 ชนิด คือ (1) phorbol esters เป็นสารพิษที่ส่งเสริมให้เกิดเนื้องอก การอักเสบวมของผิวและเร่งการทำงานของเม็ดเลือด และ (2) lectin หรือ curcin ซึ่งทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ลำคอไหม้ ท้องเดิน ม่านตาขยาย ชักและตายในที่สุด ซึ่งมีพิษคล้ายกับ ricin ที่พบในเมล็ดละหุ่ง นอกจากนั้นยังมีสารอีก 2 ชนิดซึ่งทำให้คุณค่าทางอาหารของพืชด้อยลง ได้แก่ (1) trypsin inhibitor เป็นตัวยับยั้งการย่อยโปรตีนในทางเดินอาหาร และ (2) phytate เป็นสารที่ขัดขวางกระบวนการดูดซึมแร่ธาตุพวกแคลเซียม แมกนีเซียม เหล็กและสังกะสีบริเวณลำไส้เล็ก สาร 2 ตัวหลังนี้พบในปริมาณใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่มีสารพิษ ต่อมา Makkar และคณะ (1998b) รายงานว่าเมื่อนำสายพันธุ์ที่ไม่มีพิษจากเมือง Quintana Roo (อยู่ทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ของเมือง Veracruz) มาตรวจสอบสารพิษที่อยู่ในเมล็ดทั้งก่อนและหลังคั่วด้วยความร้อน พบว่ามีปริมาณสาร phorbol esters ในเมล็ดต่ำมาก ส่วนกาก (meal) หลังจากหีบเมล็ดที่คั่วแล้ว ก็เกือบไม่มี trypsin inhibitor หลงเหลืออยู่เลย และมีปริมาณ lectin ลดลงเกือบครึ่งหนึ่งของปริมาณก่อนคั่ว ส่วนปริมาณสาร saponin ไม่เปลี่ยนแปลงหลังคั่ว แต่ phytate กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากคั่วแล้ว

ปัญหาน้ำมันดิบที่ได้จากฟอสซิลกำลังจะหมดไป ทำให้มนุษย์ต้องหาแหล่งพลังงานทดแทนที่สัมพันธ์กับพิธีสารเกียวโต ที่ต้องการให้มีการร่วมมือกันในการแก้ปัญหาภาวะโลกร้อน โดยเน้นลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก (Francis et al., 2005) ซึ่งสบู่ดำเป็นพืชทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากปาล์มน้ำมัน แต่น้ำมันปาล์มสามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งในแง่บริโภคและอุตสาหกรรม ซึ่งถ้านำมาใช้เป็นพลังงานมากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อการใช้บริโภคด้วย แต่น้ำมันสบู่ดำนั้น ไม่มีผู้บริโภคเนื่องจากมีสารพิษ จึงเหมาะที่จะใช้ประโยชน์ในแง่พลังงานมากกว่า นอกจากนั้น กากสบู่ดำยังมีศักยภาพนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์และพลังงานเชื้อเพลิงอีกด้วย (นิทยา, 2548) Francis และ Becker (2006) รายงานว่าน้ำมันสบู่ดำมีคุณสมบัติที่ได้มาตรฐาน EN 14214 ที่ทางสหภาพยุโรปกำหนดในการผลิตและจำหน่ายไบโอดีเซล นิทยา (2548) รายงานว่ามีการนำพันธุ์สบู่ดำเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ซึ่งชำนาญและชาญวิทย์ (2549) ได้รวบรวมพันธุ์สบู่ดำจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทยไว้ในรูปเมล็ดและท่อนพันธุ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-2548 ซึ่งเมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอแล้วหาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ชนิด amplified fragment length polymorphism (AFLP) พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์สูงมาก หรือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยสมควรรวบรวมสายพันธุ์สบู่ดำจากแหล่งอื่น ๆ ให้มากขึ้น เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้ได้

ผลผลิตสูงและปริมาณน้ำมันสูง สุกแก่พร้อมกัน ต้านทานต่อโรคและแมลง และมีความเป็นพิษต่ำ เพื่อนำมาใช้บริโภคและเป็นอาหารสัตว์ (Aker, 1997; Heller, 1997)

ในปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยเครื่องหมายโมเลกุลนี้ เป็นลำดับเบสช่วงใดช่วงหนึ่งบนโครโมโซม สามารถบ่งบอกตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบได้ และสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ ซึ่งวิธีนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกลดระยะเวลาในการพัฒนาสายพันธุ์ และมีความแม่นยำสูง การหาเครื่องหมายโมเลกุลทำได้ 2 วิธี คือ วิธีไฮบริดเซชัน (hybridization – based DNA fingerprint) เช่น เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นต้น และ วิธี PCR (PCR – based DNA fingerprint) เช่น เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (simple sequence repeat), SSCP (single – strand conformation polymorphism), AFLP, RAPD (random amplified polymorphic DNA) เป็นต้น ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยสุ่ม ทำให้เห็นความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่มีองค์ประกอบของ DNA หรือยีนที่แตกต่างกัน ซึ่งการแสดงออกของแถบ DNA เป็นแบบ dominant วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ไม่ซับซ้อน ค่าใช้จ่ายต่ำ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย (Williams *et al.*, 1990) ได้มีผู้นำเครื่องหมาย

ดีเอ็นเอมาประยุกต์เพื่อใช้ หาความสัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจ (gene tagging) การสร้างแผนที่จีโนม (genome mapping) การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) การตรวจสอบลูกผสม (hybrid identification) และ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic variation) (Mayer *et al.*, 1997)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์สับดูดำของไทย และจากบางประเทศของทวีปเอเชียที่ได้รวบรวมไว้ โดยใช้เทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันสูงทางพันธุกรรม เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์สับดูดำต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างสับดูดำ

รวบรวมสายพันธุ์สับดูดำจาก 4 ประเทศ คือ ไทย อินเดีย จีนและเวียดนาม รวม 34 ตัวอย่าง (Table 1) โดยรวบรวมพันธุ์ทั้งจากเมล็ดและท่อนพันธุ์ ทั้งนี้เพราะสับดูดำเป็นพืชผสมข้ามต้นเมล็ดจากต้นเดียวกันก็อาจจะมีพันธุกรรมแตกต่างกันได้ ในขณะที่ท่อนพันธุ์ที่ได้จากต้นเดียวกันจะมีพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการ การทดลองนี้จึงใช้พันธุ์จากทั้งเมล็ดและท่อนพันธุ์ พันธุ์จากประเทศไทยประกอบด้วยพันธุ์พื้นเมืองจาก จ.ชัยนาท นครราชสีมา เลยและแพร่ รวม 19 พันธุ์ พันธุ์จากประเทศอินเดียเป็นพันธุ์ทางการค้า 5 พันธุ์ ส่วนพันธุ์จากประเทศจีนและเวียดนามอีกประเทศ

ละ 5 สายพันธุ์ เป็นพันธุ์พื้นเมืองเช่นเดียวกับของไทย นำพันธุ์สบู่ดำทั้ง 34 สายพันธุ์มาปลูกในแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม แล้วนำตัวอย่างใบสดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°ซ. เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2550

การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Lambrides และคณะ (2000) เริ่มจากการบดตัวอย่างในโกร่งที่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลวและ polyvinylpyrrolidone เพื่อกำจัด phenolic compounds บดตัวอย่างจนละเอียดเป็นผง ตักใส่หลอด micro-centrifuge ขนาด 1.5 มล. เติม DNA extraction buffer (2% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20m M EDTA pH 8.0, 100m M Tris-HCl pH 8.0, 2% v/v 2-mercaptoethanol) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน 15 นาที เติมสารละลาย 5M KoAc ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65°ซ. เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด micro-centrifuge ใหม่ จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 :1 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ผสมด้วยเครื่องผสม (vortex) เป็นเวลา 20 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบน 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่ เติม absolute ethanol ที่เย็นปริมาณ 1.5 เท่าของส่วนใสที่ดูมา ผสมนาน 3 นาทีแล้วนำไปแช่เย็นที่ -20°ซ. นาน 30 นาที เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอตกมากขึ้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ตากตะกอนข้ามคืนไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้อบลมร้อน (hot air oven) นาน 4 ชม. จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer 30-50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนดีเอ็นเอละลายหมด และเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณและตรวจสอบความแตกต่างของตัวอย่างที่ต้องการศึกษาต่อไป

การทำ RAPD markers

ตรวจสอบความแตกต่างของตัวอย่างโดยใช้ RAPD primers จำนวน 37 โพรเมอร์ โดยมีชื่อของโพรเมอร์และลำดับของดีเอ็นเอ (Table 2) ส่วนประกอบของสารเคมีและเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Table 3) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละขั้นตอนโดยใช้อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน (Table 4) ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบในเครื่อง PCT-100TM Thermal Controller (MJ Research, Watertown, Mass) และตรวจสอบความแตกต่างของ PCR product ใน 3% agarose gel electrophoresis

Table 1. Codes of 34 Asian physic nut accessions their origins, and planting materials

No	Code	Origins (planting materials)	No	Code	Origins (planting materials)
1	NRS 1	Nakhon Ratchasima 1 (seed)	18	PHC 4	Phrae 4 (cutting)
2	NRS 2	Nakhon Ratchasima 2 (seed)	19	PHC 5	Phrae 5 (cutting)
3	NRS 3	Nakhon Ratchasima 3 (seed)	20	I 1	India 1 (seed)
4	NRS 4	Nakhon Ratchasima 4 (seed)	21	I 2	India 2 (seed)
5	Loei	Loei (seed)	22	I 3	India 3 (seed)
6	NRC 1	Nakhon Ratchasima 1 (cutting)	23	I 4	India 4 (seed)
7	NRC 2	Nakhon Ratchasima 2 (cutting)	24	I 5	India 5 (seed)
8	NRC 3	Nakhon Ratchasima 3 (cutting)	25	C 1	China 1 (seed)
9	NRC 4	Nakhon Ratchasima 4 (cutting)	26	C 2	China 2 (seed)
10	CNC 1	Chainat 1 (cutting)	27	C 3	China 3 (seed)
11	CNC 2	Chainat 2 (cutting)	28	C 4	China 4 (seed)
12	CNC 3	Chainat 3 (cutting)	29	C 5	China 5 (seed)
13	CNC 4	Chainat 4 (cutting)	30	V 1	Vietnam 1 (seed)
14	CNC 5	Chainat 5 (cutting)	31	V 2	Vietnam 2 (seed)
15	PHC 1	Phrae 1 (cutting)	32	V 3	Vietnam 3 (seed)
16	PHC 2	Phrae 2 (cutting)	33	V 4	Vietnam 4 (seed)
17	PHC 3	Phrae 3 (cutting)	34	V 5	Vietnam 5 (seed)

Remarks : no 1-19 are nature accessions from Thailand; no 20-24 from India; no 25-29 from China and no 30-34 from Vietnam

การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบที่เป็น polymorphic band ในรูป binary data โดยให้ค่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น 1 และการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น 0 ส่วนข้อมูลสูญหาย (missing data) ให้ค่าเป็น 999 (Figure 1) ทำการคำนวณหาค่า polymorphic information contents (PICs) (Bostein *et al.*, 1980) จากสูตร

$$PIC_i = 1 - \sum p_{ij}$$

เมื่อ p_{ij} คือ ความถี่ในการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์ และหาความ

สัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.20e (Rohlf, 1998) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของ Dice (Dice's similarity coefficient)

$$S_{ij} = 2a/(2a+b+c) \text{ (Dice, 1945) โดยที่}$$

S_{ij} = ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่าง i และ j

a = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในทั้งสองตัวอย่าง

b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน

ตัวอย่าง i แต่ไม่ปรากฏในตัวอย่าง j
 c = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน
 ตัวอย่าง j แต่ไม่ปรากฏในตัวอย่าง i
 d = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏใน
 ทั้งสองตัวอย่าง
 จากนั้นนำค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้มาจัดกลุ่ม
 โดยใช้วิธี UPGMA (unweighted pair-group
 method with arithmetic mean) (Sokal and
 Sneath, 1963) แสดงผลในรูปแบบ dendrogram

(Figure 2) และประเมินความน่าเชื่อถือของการ
 วิเคราะห์ข้อมูลโดยการคำนวณค่า matrix
 correlation ด้วยโปรแกรม MXCOMP แล้วนำ
 ค่า original similarity matrix และค่า cophenetic
 value matrix มาเปรียบเทียบกัน (Rohlf, 1998)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ในตัวอย่างสบู่ดำทั้ง 34 ตัวอย่าง เมื่อนำ
 มาหาความแตกต่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล

Table 2. Name list of 37 RAPD primers and DNA sequences used in studying genetic variation of 34 Asian physic nut accessions

Primer name	Sequence	Primer name	Sequence
A-01	CAGGCCCTTC	AG-14	CTCTCGGCGA
A-02	TGCCGAGCTG	AN-19	ACCACGCCTT
A-03	AGTCAGCCAC	AT-07	ACTGCGACCA
A-04	AATCGGGCTG	AU-03	ACGAAACGGG
A-05	AGGGGTCTTG	AU-14	CACCTCGACC
A-06	GGTCCCTGAC	AW-07	AGCCCCAAG
A-07	GAAACGGGTG	C-12	TGTCATCCCC
A-08	GTGACGTAGG	C-13	AAGCCTCGTC
A-09	GGGTAACGCC	D-20	ACCCGGTCAC
A-10	GTGATCGCAG	F-09	CCAAGCTTCC
A-11	CAATCGCCGT	H-11	CTTCCGCAGT
A-12	TCGGCGATAG	H-12	ACGCGCATGT
A-13	CAGCACCCAC	H-13	GACGCCACAC
A-15	TTCCGAACCC	H-14	ACCAGGTTGG
A-16	AGCCAGCGAA	H-15	AATGGCGCAG
A-17	GACCGCTTGT	H-18	GAATCGGCCA
A-18	AGGTGACCGT	K-08	GAACACTGGG
A-19	CAAACGTCCG	Y-02	CATCGCCGCA
A-20	GTTGCGATCC		

Table 3. Concentration and volume of reagents and enzymes used in PCR reaction.

PCR reaction	Final concentration	1X (μl)
DNA template (10 ng/μl)	20 ng/μl	2.0
10 X taq buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	1X	1.0
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	1.0
1 mM dNTPs	200 μM	2.0
Primer	0.4 μM	0.4
Taq DNA polymerase	1 U/μl	0.2
ddH ₂ O	-	3.4
Total volume		10.0

Table 4. PCR condition for amplification of the PCR products by 37 RAPD primers

PCR steps	Temp (°C)	Time (min)
Pre-denature	94	2
Denature	94	1
Annealing	35	1
Extension	72	2
Final extension	72	7
Holding	16	20

แบบ RAPD โดยใช้ 37 ไพรเมอร์ พบว่ามี 8 ไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่าง 1-4 อัลลิล/ไพรเมอร์ ซึ่งไพรเมอร์ Y-02 มีจำนวนอัลลิลสูงสุด คือ 5 ส่วน A-05, A-10, AU-03 และ D-20 ให้จำนวนอัลลิลต่ำสุดคือ 1 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอ/ไพรเมอร์ 1.75 มีค่า PICs

อยู่ระหว่าง 0.169 – 0.999 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของ PIC ของทั้ง 8 ไพรเมอร์ 0.802 ซึ่งมีค่าที่สูง เนื่องจากเมื่อคำนวณค่าความถี่ในบางไพรเมอร์ พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเพียง 1-2 ตัวอย่างเท่านั้น (Table 5) และผลการวิเคราะห์ข้อมูลสามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์สุบุดำทั้ง 34 สายพันธุ์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์จากประเทศไทยกับอินเดียและกลุ่มที่ 2 เป็นสายพันธุ์จากประเทศจีนกับเวียดนาม ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice ที่ 0.45 (Figure 2) จากกลุ่มย่อยที่ 1 พบว่าพันธุ์อินเดีย I 2 สัมพันธ์กับพันธุ์ไทยจากชัณษาที่ขยายพันธุ์จากท่อนพันธุ์ (CNC 1) และนครราชสีมาจากเมล็ด (NRS 3 และ NRS 4) อย่างสูง และในกลุ่มย่อยที่ 2 พบ I 1 และ I 5 สัมพันธ์กับพันธุ์ไทยจากชัณษาที่มาจากท่อนพันธุ์ (CNC 2, CNC 3, CNC 4 และ CNC 5) แพร่ที่มาจากท่อนพันธุ์ (PHC 1, PHC 2, PHC 3, PHC 4 และ PHC 5) และนครราชสีมาที่มาจากเมล็ด (NRS 1 และ NRS 2) ซึ่งในอนาคต ถ้ามีการเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ในการศึกษาความแตกต่างเข้าไปอีก อาจมีผลทำให้ทั้ง 2 กลุ่มย่อยนี้รวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ ส่วนสายพันธุ์จากอินเดีย (I 3 และ I 4) แยกกลุ่มออกจากกลุ่มสายพันธุ์ไทยที่มาจากเมล็ดและท่อนพันธุ์และสายพันธุ์ I 1, I 2 และ I 5 อย่างชัดเจน ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice ที่ 0.53 ส่วนกลุ่มที่ 2 ที่มาจากจีนและเวียดนามนั้น พันธุ์เวียดนาม V 4 และ V 5 แตกต่างจากสายพันธุ์อื่นของกลุ่มที่ 2 อย่างชัดเจน (Table 1) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ ใช้สายพันธุ์

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34

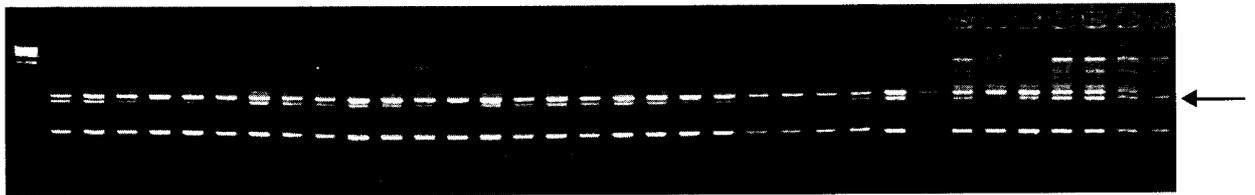


Figure 1. Amplified fragments were classified as present (1), absent (0) and missing data (999). The above bands were obtained from primer AU-03.

สับดูจาก 4 ประเทศที่มีสภาพภูมิศาสตร์แตกต่างกัน จึงคาดว่าน่าจะมีความแตกต่างกันสูงทางพันธุกรรม สอดคล้องกับการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังที่ทำการจัดกลุ่ม 8 สายพันธุ์ (2 *Manihot glaziovii*, 4 *M. esculenta*, 2 *M. glaziovii* x *M. esculenta*) จากอเมริกาใต้ และ 2 สายพันธุ์ (*M. caerulescens*) จากแอฟริกา ซึ่งตรวจสอบโดยใช้ 20 RAPD markers พบว่ามี 8 ไพรเมอร์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างใน 10 ตัวอย่างมันสำปะหลัง และเมื่อทำการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ สามารถแยกกลุ่มของสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน (Marmey *et al.*, 1994)

การทดลองนี้ทำการศึกษาเพียง 37 ไพรเมอร์ และมีไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่าง 8 ไพรเมอร์ สมควรเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ให้มากขึ้น รวมทั้งใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นที่เป็นแบบ co-dominant marker มาศึกษาร่วมด้วย เนื่องจาก RAPD marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ dominant marker ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงน้อยกว่า co-dominant marker อย่างไรก็ตาม ผลจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับดูในการศึกษานี้ เป็นที่น่าเชื่อถือได้

Table 5. Number of bands and polymorphic information contents (PICs) of 8 RAPD primers polymorphic among 34 physic nut accessions

Primer	Number of bands	PICs
A-05	1	0.999
A-08	2	0.998
A-10	1	0.999
A-11	2	0.938
A-17	2	0.996
AU-03	1	0.169
D-20	1	0.999
Y-02	4	0.314
Average	1.75	0.802

เนื่องจากมีค่า cophenetic correlation สูงถึง 0.92 แสดงว่าเป็นการจัดกลุ่มสับดูที่ดี จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์สับดูของไทยได้ในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD ของสับดูจำนวน 34 ตัวอย่างจาก 4 ประเทศ คือ

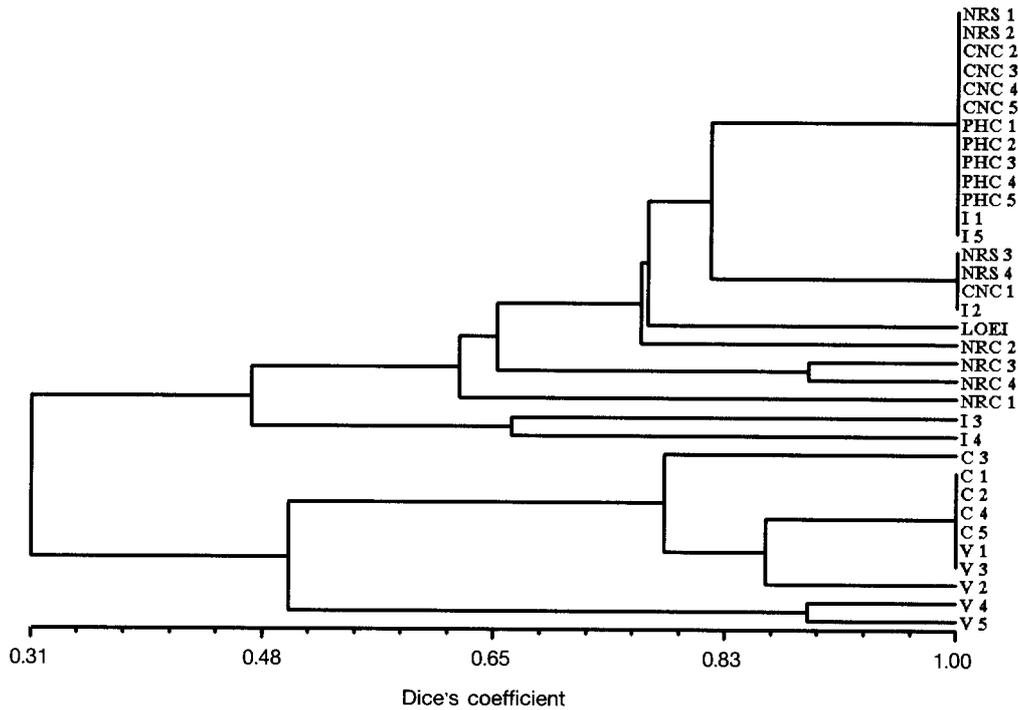


Figure 2. A dendrogram of 34 physic nut accessions created by UPGMA of Dice's similarity coefficient using NTSYS-pc version 2.20e

ไทย อินเดียน จีนและเวียดนาม โดยใช้วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) จำนวน 37 โพรเมอร์ พบว่ามี 8 โพรเมอร์ที่สามารถตรวจวัดความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง เมื่อแบ่งกลุ่มโดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient ที่ 0.45 โดยสามารถแบ่งกลุ่มสับุดำได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มไทยกับอินเดียน และกลุ่มจีนกับเวียดนาม

คำนิยาม

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้ ภายใต้แผนงานวิจัย ความร่วมมือวิจัย พัฒนาและส่งเสริมพืชวงศ์ถั่วและพืชพลังงานในอนุภูมิภาคลุ่มน้ำโขง

เอกสารอ้างอิง

- ชำนาญ ฉัตรแก้ว และชาญวิทย์ ม่วงมิตร. ใน : การวิจัยและพัฒนาสับุดำ หน้า 18-25. สับุดำ พืชพลังงานทดแทน. ชำนาญ ฉัตรแก้ว (บรรณาธิการ) ฟันนี้ พับบลิชซิ่ง กรุงเทพฯ. นิทยา อักษรเนียม. 2548. สับุดำ ป้อน้ำมันบนดินของคนไทย. ว. เกษการเกษตร 29 (8): 216-223.
- ประโยชน์ ตันติเจริญยศ. 2549. ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ของต้นสับุดำ. หน้า 93-99. ใน : สับุดำ พืชพลังงานทดแทน. ชำนาญ ฉัตรแก้ว (บรรณาธิการ) ฟันนี้ พับบลิชซิ่ง กรุงเทพฯ. สมบัติ ชินะวงศ์. 2549. สับุดำ การปลูกและการสร้างมูลค่าเพิ่มจากผลพลอยได้. ฝ่ายการ

- พิมพ์ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม
กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
จ. นครปฐม. 58 หน้า.
- Aker, C.L. 1997. Growth and reproduction of *J. curcas*, Pages 2-18. In: *Biofuels and Industrial Products from Jatropha curcas*. G.M. Gubitz, M. Mittelbach and M. Trabi (eds.), DbV-Verlag für die Technische Universität Graz, Austria.
- Bostein, D., R.L. White, M. Sholnick and R.W. David. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297-302.
- Francis, G., R. Edinger and K. Becker. 2005. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Nat. Res. Forum* 29:12-24.
- Francis, G. and K. Becker. 2006. *Jatropha biodiesel for tropical countries*. *Nachwachsende Rohstoffe* Nr. 39-März 2006. <http://www.bl.t.bmf.gv.at/vero/mnawa/nr39.pdf>, 18/7/2007.
- Heller, J. 1996. *Physic Nut, Jatropha curcas L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. Institution of Plant genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 66 p.
- Heller, J. 1997. *J. curcas*: Potential, Limitations and Future Research Needs. Pages 242-254. In: *Biofuels and Industrial Products from Jatropha curcas* G.M. Gubitz, M. Mittelbach and M. Trabi (eds.). DbV-Verlag für die Technische Universität Graz, Austria.
- Lambrides, C.J., R.J. Lawn, I.D. Godwin, J. Manners and B.C. Imrie. 2000. Two genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 415-425.
- Makkar, H.P.S., A.O. Aderibigbe and K. Becker. 1998 a. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chemistry* 62: 207-215.
- Makkar, H.P.S., K. Becker and B. Schmook.

- 1998 b. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Foods Hum. Nutr.* 52: 31-36.
- Marmey, P., J.R. Beeching, S. Hamon and A. Charrier, 1994. Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collections using RAPD markers. *Euphytica* 74: 203–209.
- Mayer, M.S., A. Tullu, C.J. Simon, J. Kumar, W.J. Kaiser, J.M. Kraft and F.J. Muelbauer, 1997. Development of a DNA marker for *Fusarium* wilt resistance in chickpea. *Crop. Sci.* 37: 1625–1629.
- Rohlf, F.J. 1998. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, NTSYS-pc Program Manual Version 2.20e. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Sokal, R.R. and P.H.A. Sneath. 1963. *Principle of Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco. 395 p.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531 – 6535.