การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นสบู่ดำในประเทศไทย โดยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA

The Study of Genetic Diversity of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand Using Random Amplified Polymorphic DNA

พรเทพ เกียรติดำรงค์กุล*, สมชาติ หาญวงษา, ยรรยง เฉลิมแสน และณวรรณพร จิรารัตน์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา พิษณุโลก ตำบลบ้านกร่าง อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Pornthep Keadtidumrongkul*, Somchart Hanvangsa, Yanyong Chalermsan and Nawannaporn Chirarat

Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna Phitsanulok, Bankrang, Muang, Phitsanulok 65000

บทคัดย่อ

สบู่ดำเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกา มีมากกว่า 200 สปีชีย์ กระจายอยู่ในเขตร้อน ซึ่งสบู่ดำเป็นพืชที่ใช้ผลิตน้ำมันไบโอดีเซล การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นสบู่ดำในประเทศไทยจาก 9 ประชากร โดยใช้เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) พบว่าจาก 68 ไพรเมอร์ มี 10 ไพรเมอร์ ที่นำมาใช้ ให้แถบดีเอ็นเอ 68 แถบ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร พบว่าค่า percentage polymorphic loci อยู่ระหว่าง 16.18 ถึง 52.94 จากการศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ระหว่าง 0.0121 ถึง 0.4372 ซึ่งจากระยะห่างทางพันธุกรรมชี้ให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอยู่ในระดับต่ำ จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ dendrogram โดย UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างประชากรของต้นสบู่ดำได้ 2 กลุ่ม

คำสำคัญ : สบู่ดำ; อาร์เอพีดี; ความหลากหลาย

Abstract

Jatropha is one of a native plant of America continent. There are over 200 species that are widely distributed in tropics. Jatropha is a promising oil crop for bio-diesel. This investigation was

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** genetics58@hotmail.com

carried out to assess the genetic diversity of 9 populations based on random amplified polymorphic DNA marker. Within 68 random primer used, 10 primers gave reproducible amplification banding patterns of 68 polymorphic bands. Genetic diversity greatly varied among the population, by which the percentage of polymorphic loci values range from 16.18 to 52.94. Genetic distance varied from 0.0121 to 0.4372. These indicate low level of genetic variation among the population of Jatropha sample. The UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) cluster analysis indicated two distinct clusters of Jatropha sample.

Keywords: physic nut; RAPD; diversity

1. บทนำ

สบู่ดำหรือ physic nut จัดเป็นหนึ่งในพืชพลังงานที่คาดว่าจะนำมาพัฒนาเป็นน้ำมันไบโอดีเซลในประเทศไทยเช่นเดียวกับปาล์มน้ำมัน ด้วยสมบัติเฉพาะตัวด้านการให้น้ำมันของพืชชนิดนี้ ประกอบกับมีผลงานวิจัยออกมายืนยันอย่างชัดเจนแล้วว่าสมบัติดังกล่าวของเมล็ดสบู่ดำสามารถนำไปพัฒนาเป็นไบโอ-ดีเซลได้จริง [1] นำไปสู่การคาดหมายกันว่าพืชชนิดนี้ในอนาคตอันใกล้น่าจะมีอนาคตที่สดใสในแง่ของการเป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับรองดูแลจากรัฐบาลเช่นเดียวกับปาล์มน้ำมัน แต่การศึกษาด้านพันธุกรรมของต้นสบู่ดำในประเทศไทยมีน้อยมาก โดยเฉพาะการศึกษาด้านพันธุกรรมในพื้นที่ต่าง ๆ ยังไม่ได้มีการศึกษาวิจัยอย่างละเอียด ทำให้ไม่มีข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะใช้อ้างอิงเพื่อที่จะนำผลการศึกษาไปใช้เป็นข้อมูลในเรื่องความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ของต้นสบู่ดำที่จะส่งเสริมให้เป็นพืชเศรษฐกิจในอนาคต

ในประเทศไทยมีการปลูกสบู่ดำทั่วทุกภาคของประเทศไทย [2] พบว่ามีสบู่ดำหลายสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย ดังนั้นการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ก่อนที่จะมีการปลูกเป็นสิ่งสำคัญ เพราะถ้าเมล็ดพันธุ์ไม่ตรงตามพันธุ์จะทำให้จำนวนผลผลิตลดลงและเปอร์เซ็นต์น้ำมันในเมล็ดลดลงด้วย เนื่องจากในอดีตการตรวจสอบสายพันธุ์จะตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้เวลานานและไม่แม่นยำ ดังนั้นเพื่อให้เกิดความรวดเร็วและผลที่ได้มีความแม่นยำจึงมีการนำเทคนิคทางเครื่องหมายทางพันธุกรรมมาใช้ เพื่อบ่งชี้ความจำเพาะของสายพันธุ์ ปัจจุบันเทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA) [3] จัดเป็นเทคนิคที่ง่ายสะดวกและรวดเร็ว ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นสายเดียวแล้วทำให้เกิดแถบเอ็นเอขนาดต่าง ๆ กัน ซึ่งสามารถใช้บอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ อีกทั้งสามารถใช้กับตัวอย่างดีเอ็นที่มีปริมาณน้อย [4] และค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก ดังนั้นเทคนิค RAPD จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาในพืชหลายชนิด ได้แก่ กล้วย [5] แตงกวา [6] มะเขือเทศ [7] แตงโมง [8] มะละกอ [9] ฝ้าย [10] เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงนำเทคนิค RAPD มาใช้เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างต้นสบู่ดำและการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างต้นสบู่ดำที่นำมาศึกษา เป็นต้นสบู่ดำที่มีจำนวน 9 ประชากร จาก 9 จังหวัด คือ น่าน ลำปาง ตาก ชัยภูมิ อุทัยธานี ขอนแก่น พิษณุโลก นครสวรรค์ และสุโขทัย จังหวัดละ 2-5 ต้น รวมทั้งหมด 40 ต้น (ตารางที่ 1) นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB

ดัดแปลงจาก Agrawal และคณะ [11]

ตารางที่ 1 ตัวอย่างต้นสบู่ดำที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร

รหัส	แหล่งพันธุ์	จำนวนต้น
POP-1	จังหวัดน่าน	5
POP-2	จังหวัดลำปาง	5
POP-3	จังหวัดตาก	5
POP-4	จังหวัดชัยภูมิ	5
POP-5	จังหวัดอุทัยธานี	5
POP-6	จังหวัดขอนแก่น	4
POP-7	จังหวัดพิษณุโลก	5
POP-8	จังหวัดนครสวรรค์	2
POP-9	จังหวัดสุโขทัย	4

2.2 ตรวจสอบข้อมูลเครื่องหมาย RAPD ของต้นสบู่ดำจากฐานข้อมูลและสังเคราะห์ไพรเมอร์

ตรวจสอบข้อมูลงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอกับต้นสบู่ดำจากฐานข้อมูล GenBank โดยเลือกเครื่องหมายที่มีรายงานการตรวจสอบในพืชมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้มาเลือกสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยเลือกไพรเมอร์ที่ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีจำนวนแอลลีลมาก ซึ่งสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 68 ไพรเมอร์

2.3 การทดสอบเพื่อเลือกไพร์เมอร์และสภาวะ ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำทั้ง 68 ไพรเมอร์ มาทดสอบเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในต้นสบู่ดำ 9 ตัวอย่าง จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการพีซีอาร์ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 พิโคโมล/ไมโคร ลิตร) 2 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50mM) 0.8 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยารอบแรก 94 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบที่ 2-30 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นแยกขนาด ดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้วุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TAE ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า 135 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที และย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ppm นาน 10 นาทีจากนั้นล้างน้ำนาน 5 นาที เพื่อเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 9 ตัวอย่าง

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

จากไพรเมอร์ 68 ไพรเมอร์ สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 10 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 9 ตัวอย่าง นำมาใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของต้นสบู่ดำทั้งหมด วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูล โดยอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลและบันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์คือ “1” กับการมีแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับการไม่มีแถบดีเอ็นเอ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่า polymorphic loci, percentage polymorphic loci, gene diversity (H), Shannon’ s information index (I), total genetic diversity (H_T), genetic diversity within the population (H_S), variability among the polulation (G_{st}) จำนวนผู้อพยพ (migration) ต่อรุ่น (N_m) และความแตกต่างของประชากร (genetic distance) ด้วยโปรแกรม POPGENE เวอร์ชัน 1.31 โดยสร้าง dendrogram ด้วยโปรแกรม Phylip 3.5

3. ผลการวิจัย

3.1 การทดสอบเพื่อเลือกไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จากการใช้ไพรเมอร์ 68 ไพรเมอร์ ของบริษัท Invitrogen ที่มีความยาว 10-11 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำมาตรวจสอบกับดีเอ็นของต้นสบู่ดำตัวอย่างที่สุ่มจาก 9 จังหวัด ในงานวิจัยครั้งนี้มีเพียง 10 ไพรเมอร์ ที่พบแถบดีเอ็นเอมากกว่า 3 แถบ (ตารางที่ 2) โดยไพรเมอร์ OPA ได้จากงานทดลองของ Shafi และคณะ [12] และไพรเมอร์ RIT ออกแบบโดยใช้โปรแกรม OligoAnalyzer 3.1

ตารางที่ 2 จำนวนแถบดีเอ็นเอนของไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนแถบ DNA
OPA-4	5'-AATCGGGCTG-3'	7
RIT-2	5'-ATTGGGCGAT-3'	8
RIT-16	5'-CACGGCGAGT-3'	8
RIT-17	5'-CAGCGAACTA-3'	9
RIT-21	5'-TGCAGTCGAA-3'	7
RIT-36	5'-GCCACGGAGA-3'	5
RIT-37	5'-TCCCGAACCG-3'	6
RIT-40	5'-CCGCCTTACA-3'	7
RIT-42	5'-CCCACTGACG-3'	6
RIT-49	5'-ACTGACCGGC-3'	5

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

3.2.1 การศึกษา polymorphic loci ของประชากรในต้นสบู่ดำ

การศึกษา polymorphic loci ของประชากรในต้นสบู่ดำซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 10 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 68 แถบ เมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาคำนวณค่า polymorphic loci และ percentage polymorphic loci พบว่าประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำจากจังหวัดชัยภูมิและสุโขทัยมีจำนวน polymorphic loci สูงสุด 36 loci และ percentage polymorphic loci 52.94 เปอร์เซ็นต์ และประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำจากจังหวัดนครสวรรค์มีจำนวน polymorphic loci ต่ำสุด 11 loci และ percentage polymorphic loci 16.18 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่า polymorphic loci และ percentage polymorphic loci ในประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจาก 9 จังหวัด

ประชากร	Polymorphic loci	Percentage Polymorphic loci
น่าน	33	48.33
ลำปาง	34	50.00
ตาก	21	30.88
ชัยภูมิ	36	52.94
อุทัยธานี	30	44.12
ขอนแก่น	18	26.47
พิษณุโลก	16	23.53
นครสวรรค์	11	16.18
สุโขทัย	36	52.94

จำนวน loci ทั้งหมด 68 loci

3.2.2 การศึกษาความหลากหลายของยีนในประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจาก 9 จังหวัด

ผลการศึกษาความหลากหลายของยีน (gene diversity, H) และ Shannon' s index (I) [13] โดยใช้โปรแกรม POPGENE เวอร์ชัน 1.31 [14] พบว่าค่า H เท่ากับ 0.0670-0.2106 และค่า I เท่ากับ 0.0978-0.3064 โดยประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำจากจังหวัดชัยภูมิมีความความหลายหลายของยีนสูงที่สุด โดยมีค่า H เท่ากับ 0.2106 และค่า I เท่ากับ 0.3064 และประชากรต้นสบู่ดำจากจังหวัดนครสวรรค์มีความ

ความหลายหลายของยีนต่ำที่สุดโดยมีค่า H 0.0670 และค่า I เท่ากับ 0.0978 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา polymorphic loci และ percentage polymorphic loci ที่พบว่า polymorphic loci และ percentage polymorphic loci สูงสุดพบที่ประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจากจังหวัดชัยภูมิ และต่ำสุดพบที่ตัวอย่างประชาการต้นสบู่ดำที่สุ่มจากจังหวัดนครสวรรค์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ค่า genetic diversity ในประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจาก 9 จังหวัด

ประชากร	H (gene diversity)	I (Shannon's information index)
น่าน	0.1863	0.2706
ลำปาง	0.1667	0.2532
ตาก	0.1140	0.1694
ชัยภูมิ	0.2106	0.3064
อุทัยธานี	0.1742	0.2551
ขอนแก่น	0.0892	0.1356
พิษณุโลก	0.0679	0.1092
นครสวรรค์	0.0670	0.0978
สุโขทัย	0.1960	0.2920

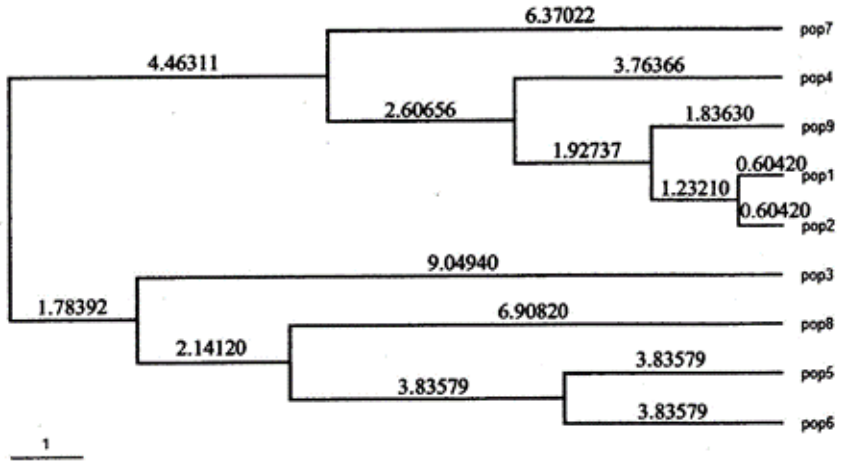
3.2.3 การจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจาก 9 จังหวัด

จากข้อมูลลายพิมพ์ RAPD ที่ได้ นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอของตัวอย่าง โดยให้สัญลักษณ์เป็น "1" เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้สัญญาลักษณ์เป็น "0" เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แล้ววิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรม POPGEN 1.31 โดยวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มแต่ละจังหวัด นำค่าระยะห่างระหว่างประชากรที่ได้ไปเขียนเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ dendrogram (รูปที่ 1) ด้วยโปรแกรม Phylip 3.5 ซึ่งสามารถแบ่งประชากรของต้นสบู่ดำได้ 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ ประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจากจังหวัดน่าน ลำปาง ชัยภูมิ พิษณุโลก และสุโขทัย กลุ่มที่ 2 คือ ประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจากจังหวัดตาก ขอนแก่น อุทัยธานี และนครสวรรค์

3.2.4 โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจาก 9 จังหวัด

ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ค่า Nei' s gene diversity คำนวณโดยโปรแกรม POPGENE เวอร์ชัน 1.31 [14] ตามวิธีของ Nei [15]

โดยคำนวณความหลากหลายของยีนในประชากร (H_S) ความหลากหลายของยีนรวมจากทุกประชากร (H_T) และคำนวณสัดส่วนความหลากหลายของยีนระหว่างกลุ่ม (G_{st}) จากสูตร $G_{st} = [(H_T-H_S)/ H_T]$ จากความหลากหลายของประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำ 40 ต้น จาก 9 จังหวัด พบว่าค่า HT เท่ากับ 0.2725 ค่า H_S เท่ากับ 0.1412 และค่า G_{st} เท่ากับ 0.4817 คิดเป็น 0.48 เปอร์เซ็นต์ หมายความว่าในประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำ 40 ต้น จาก 9 จังหวัด มีสัดส่วนของความหลากหลายของยีนระหว่างประชากร 0.4817 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้เราแบ่งประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม (รูปที่ 1) แต่เมื่อพิจารณาความหลากหลายของประชากรต้นสบู่ดำเป็นกลุ่มย่อยของแต่ละจังหวัดทั้งหมด 9 จังหวัด พบว่าประชากรต้นสบู่ดำแต่ละจังหวัดมีค่า H_T และ H_S เท่ากัน จึงทำให้สัดส่วนความหลากหลายของยีนระหว่างประชากรภายในกลุ่มตัวอย่างที่สุ่มทั้ง 9 จังหวัด มีค่า G_{st} เท่ากับ 0 (ตารางที่ 5) แสดงว่าประชากรต้นสบู่ดำภายในกลุ่มจังหวัดมีโครงสร้างพันธุกรรมคล้ายคลึงกันและจากค่าจำนวนผู้อพยพ (migration) ต่อรุ่น (N_m) ที่สูงถึง 2,000 ต่อรุ่น ภายในกลุ่มประชากรต้นสบู่ดำของแต่ละ



รูปที่ 1 Dendrogram ของประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจาก 9 จังหวัด ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม POPGEN เวอร์ชัน 1.31 โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิค RAPD [scale bar คือ ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)]

ตารางที่ 5 ค่า genetic diversity ในประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจาก 9 จังหวัด

ประชากร	H_T	H_S	G_{st}	N_m
POP-1	0.1863	0.1863	0	2000
POP-2	0.1667	0.1667	0	2000
POP-3	0.1140	0.1140	0	2000
POP-4	0.2106	0.2106	0	2000
POP-5	0.1742	0.1742	0	2000
POP-6	0.0892	0.0892	0	2000
POP-7	0.0697	0.0697	0	2000
POP-8	0.0670	0.0670	0	2000
POP-9	0.7960	0.7960	0	2000

H_T = total genetic diversity; H_S = genetic diversity within the population; G_{st} = variability among the population; N_m = the actual number of migrants per generation

แต่ละจังหวัด แสดงให้เห็นว่าแต่ละกลุ่มประชากรมีการอพยพเกิดขึ้น 2,000 ต้นในทุก ๆ รุ่น ซึ่งถ้าสิ่งมีชีวิตมีการอพยพเข้าหรือออกของสมาชิก ส่งผลให้มีการถ่ายเทเคลื่อนย้ายยีน (gene flow) เกิดขึ้นระหว่างประชากรย่อย ๆ ภายในจังหวัดนั้น ๆ ซึ่งการอพยพจะทำให้สัดส่วนของยีนเปลี่ยนแปลงไป แต่ในประชากรที่มีขนาดใหญ่มาก ๆ การอพยพเข้าหรืออพยพออกของสมาชิกจะไม่มีผลต่อสัดส่วนของยีนในกลุ่มประชากรเลย [16] ซึ่งเมื่อมีจำนวนผู้อพยพต่อรุ่นสูงทำให้การถ่ายเทเคลื่อนย้ายยีนระหว่างประชากรภายในจังหวัดเดียวเกิดขึ้นสูงตามไปด้วยทำให้ความถี่ของอัลลีลในประชากรภายในจังหวัดเดียวกันมีแนวโน้มแตกต่างกันน้อยลงเรื่อย ๆ จนในที่สุดเปรียบเสมือนเป็นประชากรเดียวกัน [17]

4. สรุป

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นสบู่ดำ จำนวน 40 ตัวอย่าง ที่สุ่มจากประชากรตัวอย่าง 9 จังหวัด ได้แก่ น่าน ลำปาง ตาก ชัยภูมิ อุทัยธานี ขอนแก่น พิษณุโลก นครสวรรค์ และสุโขทัย จากการศึกษาพบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของ

ต้นสบู่ดำด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Agrawal และคณะ [11] เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 68 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ สามารถให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจำนวน 68 แถบ และผลจาก dendrogram ของตัวอย่างประชากรต้นสบู่ดำจาก 9 จังหวัด ที่สร้างขึ้นสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ ประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจากจังหวัดน่าน ลำปาง ชัยภูมิ พิษณุโลก และสุโขทัย กลุ่มที่ 2 คือ ประชากรตัวอย่างต้นสบู่ดำที่สุ่มจากจังหวัดตาก ขอนแก่น อุทัยธานี และนครสวรรค์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มต้นสบู่ดำจำนวน 128 ตัวอย่าง จากทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมจากเครื่องหมาย AFLP (amplified fragment length polymorphism) พบว่าสามารถจัดจำแนกต้นสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยต้นสบู่ดำ 127 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยต้นสบู่ดำ 1 ตัวอย่าง จากสหรัฐอเมริกา [18] ในทำนองเดียวกัน Basha และ Sujatha [19] ได้จัดกลุ่มต้นสบู่ดำจำนวน 42 ตัวอย่าง จากพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ในประเทศอินเดียร่วมกับต้นสบู่ดำพันธุ์ที่ไม่มีพิษจากประเทศเม็กซิโก โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมจากเครื่องหมาย ISSR (inter simple sequence repeat) ซึ่งพบว่าสามารถจำแนกต้นสบู่ดำเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยต้นสบู่ดำ 42 ตัวอย่าง จากประเทศอินเดีย ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นต้นสบู่ดำไม่มีพิษจากเม็กซิโก จึงเห็นได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ เช่น AFLP, ISSR และ RAPD สามารถจัดแบ่งต้นสบู่ออกได้เพียง 2 กลุ่มใหญ่ เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากต้นสบู่ดำที่ใช้ในการศึกษามีความคลายคลึงทางพันธุกรรมสูง หากต้องการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมให้กับต้นสบู่ดำจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นเข้าช่วย เช่น การผสมข้ามพืชต่างชนิดหรือสกุล การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือการถ่ายยีนให้กับต้นสบู่ดำโดยตรง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ที่สนับสนุนทุนวิจัย

6. รายการอ้างอิง

[1] Mohibbe, A.M., Waris, A. and Nahar, N.M., 2005, Prospect and potential of fatty acid methyl esters of somenon-traditional seed oils for use as biodiesel in India, Biomass Bioen. 29: 293-302.

[2] สุรินทร์ หลวงนาม, 2548, ปลูกพืชน้ำมันเพื่อสร้างพลังงานทดแทน, ว.เกษตรราชภัฏ 4(1): 36-40.

[3] Williams, G.K.J., Kubelik, R.A., Livak, J.K., Rafalski, J.A. and Tingey, V.S., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker, Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

[4] Devos, K.M. and Gale, M.D., 1992, The use of random amplified polymorphic DNA markers in Wheat, Theor. Appl. Genet. 84: 567-572.

[5] Faure, S., Noyer, J., Horry, J.P., Bakry, F., Lanaud, C. and Gonzalez-de-Leon, D., 1993, A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminate*), Theor. Appl. Genet. 87: 517-526.

[6] Kennard, W.C., Poetter, K., Dijkhuizen, A., Meglic, V., Staub, J.E. and Havey, M.J., 1994, Linkages among RFLR, RAPD, isozyme,

disease-resistance and morphological markers in marrow and wide crosses of cucumber, Theor. Appl. Genet. 89: 42-48.

[7] Ohmori, T., Murata, M. and Motoyoshi, F., 1995, Identification of RAPD markers linked to the Tm-2 locus in tomato, Theor. Appl. Genet. 90: 307-311.

[8] Lee, S.J., Shin, J.S., Park, K.W. and Hong, Y.P., 1996, Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanantus* (Thumb.) Mansf.] germplasm, Theor. Appl. Genet. 92: 719-725.

[9] Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K. and Ban, Y., 2002, A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.), Theor. Appl. Genet. 104: 281-285.

[10] Lu, H.J. and Myer, G.O., 2002, Genetic relationships and discrimination of ten influential upland cotton varieties using RAPD markers, Theor. Appl. Genet. 105: 325-331.

[11] Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P., 1992, Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves, Biotech. Biodiv. Lett. 2: 19-24.

[12] Shafi, N., Janjua, S., Jafar, S., Anwar, K. and Mian, A., 2015, Optimization of DNA extraction and PCR protocal for RAPD analysis of *Tor putitora*, JAPS. 25: 536-541.

[13] Shannon, C.E., 1948, A mathematical theory of communication, Bell Syst. Tech. J. 27: 379-423.

[14] Yeh, F.C. and Yang. R., 1999, Microsoft Window Based Freeware for Population Genetic Analysis (POPGENE version 1.31), University of Alberta, Canada.

[15] Nei, M., 1973, Analysis of gene diversity in subdivided populations, Proc. Nat. Acad. Sci. 70: 3321-3323.

[16] Wang, J., 2004, Application of the One-Migrant-per-Generation rule to conservation and management, Conserv. Biol. 18: 332-343.

[17] Whitlock, M.C. and McCauley, D.E., 1999, Indirect measures of gene flow and migration: FST[ne]1/(4Nm+1), Heredity 82: 117-125.

[18] ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร, ประภา ศรีพิจิตต์, วิภา หงส์ตระกูล และรังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ, 2558, ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางการเกษตร และเครื่องหมายดีเอ็นเอ, Thai J. Genet. 8: 26-37.

[19] Basha, S.D. and Sujatha M., 2007, Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers, Euphytica 156: 375-386.