

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสนุ่นดำในประเทศไทย
ด้วยวิธีอาร์เอพีดี

มลิวรรณ นาคขุนทด*¹ และ ปัทมา เสนทอง²

Investigation of Genetic Diversity of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand
using RAPD

Maliwan Nakkuntod*¹ and Pattama Senthong²

¹หน่วยวิจัยพันธุศาสตร์และชีววิทยาโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

²สาขาเทคโนโลยีการจัดการอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84000

*Corresponding author. E-mail: lotharmali@yahoo.com

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสนุ่นดำ (*Jatropha curcas* L.) ในประเทศไทย 46 ตัวอย่างที่รวบรวมจากศูนย์วิจัยพืชไร่ นครราชสีมาด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) จากไพรเมอร์จำนวน 60 ไพรเมอร์ พบว่ามี 12 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน (20%) จำนวน 64 แถบ มีขนาด 250-2,500 คู่เบส มีดัชนีความเหมือน (Similarity Index) อยู่ระหว่าง 0.5706-0.9881 ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ JAT-05 และ JAT-12 ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทุกตัวอย่าง ขณะที่ไพรเมอร์ TSC-05 พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสนุ่นดำหมายเลข 5114 จำนวน 1 แถบ (600 คู่เบส) และเมื่อวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc, version 2.10m แบบ UPGMA แสดงผลในรูปของ dendrogram พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มสนุ่นดำออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 มีเพียง 1 ตัวอย่างคือ สนุ่นดำหมายเลข 5101 ที่มีดัชนีความเหมือนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 อยู่ระหว่าง 0.7147-0.9678 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสนุ่นดำ 39 ตัวอย่างมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.5706-0.9881 และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสนุ่นดำ 6 ตัวอย่างมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.7230-0.9309 สนุ่นดำหมายเลข 5116 และ 5119 ถือว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด ขณะที่สนุ่นดำหมายเลข 5125 และ 8114 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด โดยมีค่าดัชนีความเหมือน 0.9881 และ 0.5706 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0b10 แสดงผลในรูป phylogram พบว่าในบาง

ตัวอย่างมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน แต่โดยภาพรวมแล้วยังไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสกุลต่างๆได้

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม สบู่ดำ อาร์เอพีดี

Abstract

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to investigate levels of genetic diversity among 46 samples of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand, which were collected from Nakhon Ratchasima Field Crops Research Center. RAPDs generated by 12 out of 60 different primers (20%) produced 64 bands. Average size of the amplified DNA fragments ranged from 250 to 2,500 bp and similarity index ranged from 0.5706 to 0.9881. JAT-05 and JAT-12 primers produced monomorphism, whereas TSC-05 primer produced specific band at 600 bp in sample 5114. Dendrogram was drawn using NTSYS-pc, version 2.10m, UPGMA method. The results showed 3 groups in physic nut samples. The first group consists of only one sample (5101) which similarity index from 0.7147 to 0.9678 when compared with group 2 and 3. The second group consists of 39 samples with similarity index from 0.5706 to 0.9881. The last group consists of 6 samples with similarity index from 0.7230 to 0.9309. Samples 5116 and 5119 were the most related ones with similarity index of 0.9881 while samples 5125 and 8114 were the least related with similarity index of 0.5706. Finally, the phylogram was generated by PAUP* version 4.0b10 indicated that some samples of physic nut were closely relationship but the overview of relationship in all samples hasn't known yet.

Keywords: genetic diversity, physic nut, *Jatropha curcas* L., RAPD

บทนำ

ในปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบกับวิกฤตการณ์น้ำมันปิโตรเลียมมีราคาสูงขึ้น ส่งผลให้ทุกประเทศค้นหาพลังงานจากแหล่งต่างๆ ขึ้นมาทดแทนซึ่งรวมถึงน้ำมันที่ได้จากพืช เช่น ปาล์ม น้ำมัน ถั่วเหลือง มะพร้าวและสบู่ดำ (Mohibbe *et al.*, 2005) เมื่อเปรียบเทียบข้อดี ข้อเสียและต้นทุนที่ใช้ในการผลิตแล้ว พบว่าสบู่ดำเป็นพืชที่ปลูกง่าย ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี เจริญเติบโตเร็ว สามารถให้ผลผลิตได้หลังจากการปลูก 8-10 เดือน และจากงานวิจัยการใช้ น้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำกับเครื่องยนต์ดีเซล พบว่ามีความสิ้นเปลืองพลังงานน้อยกว่าน้ำมันดีเซลเล็กน้อย ทั้งยังเดินเครื่องได้สม่ำเสมอไม่มีการน็อก นอกจากนี้ยังมีควันดำและคาร์บอนมอนอกไซด์ต่ำกว่าน้ำมันดีเซลและต่ำกว่าค่ามาตรฐานและไม่พบ

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งพบในไอเสียของเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันดีเซลด้วย (อนุสรณ์ กาญจนภักดิ์, 2548) อีกทั้งสบู่ดำยังเป็นพืชที่อนุรักษ์สิ่งแวดล้อม (Eco-friendly) คือเมื่อปลูกสบู่ดำเป็นเวลานานจะทำให้สภาพนิเวศน์ที่เสียหายกลับคืนสู่ธรรมชาติ (Openshaw, 2000) ทุกส่วนของต้นสบู่ดำสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย (Gübitz *et al.*, 1999) เช่น เมล็ดนอกจากจะสกัดน้ำมันมาใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซลแล้ว กากที่เหลือสามารถนำมาทำเป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้เป็นอย่างดี เพราะมีธาตุอาหารหลักสูง ดังนั้นการส่งเสริมและพัฒนาให้มีการปลูกพืชชนิดนี้จึงควรให้ความสำคัญ

ในประเทศไทยมีการปลูกสบู่ดำทั่วประเทศ (สุรินทร์ หลวงนา, 2548) ซึ่งพบว่ามีสบู่ดำหลายสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตค่อนข้างสูง ดังนั้นการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ก่อนที่จะมีการปลูกเป็นสิ่งสำคัญ เพราะถ้าเมล็ดไม่ตรงตามพันธุ์จะทำให้จำนวนผลต่อช่อลดลงและเปอร์เซ็นต์น้ำมันในเมล็ดลดลงด้วย เนื่องจากในอดีตการตรวจสอบสายพันธุ์ต้องนำเมล็ดมาปลูกเพื่อตรวจสอบทางสัตวศาสตร์ซึ่งต้องใช้เวลานานและไม่แม่นยำ ดังนั้นเพื่อให้เกิดความรวดเร็วและผลที่ได้มีความแม่นยำจึงมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมมาใช้ เพื่อบ่งชี้ความจำเพาะของสายพันธุ์ ปัจจุบันเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) จัดเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอและยังใช้ในการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานได้ด้วย (Wachira *et al.*, 1995) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นวิธีที่ง่ายสะดวกและรวดเร็ว ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นสายเดี่ยวแล้วทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ กัน ซึ่งสามารถใช้บอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ อีกทั้งสามารถใช้กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย (Devos and Gale, 1992) และค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก ดังนั้นเทคนิค RAPD จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น กัญชง (Faure *et al.*, 1993) แดงกวา (Kennard *et al.*, 1994) มะเขือเทศ (Ohmori *et al.*, 1995) แดงโม (Lee *et al.*, 1996) มะละกอ (Urasaki *et al.*, 2002) ฝ้าย (Lu and Myers, 2002) เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงนำเทคนิค RAPD มาใช้เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของสบู่ดำ 46 ตัวอย่างที่เก็บจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครราชสีมา อำเภอสี่คิ้ว จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมสายพันธุ์สบู่ดำครอบคลุมทั่วทั้งประเทศไทย ด้วยวิธี CTAB method (Meyer, 1999) แล้วตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 1% และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

2. คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากจำนวน 60 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ปริมาณมากและชัดเจน เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่คาดว่าจะแสดงให้เห็นความแตกต่างโดยเปรียบเทียบ

รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 40 นาโนกรัม dNTP (Promega) 200 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ 1.5 ไมโครโมลาร์ ไพริเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์ และ 0.5U Taq DNA polymerase (Fermentas)

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง GeneAmp[®] PCR System 9700 โดยการทำให้ ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturation) ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ไพริเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ ต้นแบบ (annealing) ที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกโดยให้เคลื่อนที่ ภายใต้อิทธิพลของไฟฟ้าในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% ในสารละลาย 1xTBE และใช้ความต่าง ศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ug/ml แล้ว นำไปส่องด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพ แล้วทำการทดลองด้วยไพริเมอร์เดิม จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันว่ารูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ดังที่

4. วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบตัวอย่างทีละคู่แล้วคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่าง ตัวอย่างจากสัดส่วนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทั้งสองตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด (F) (Nei and Li, 1979) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้เลข “1” เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และเลข “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน และนำความแตกต่างที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc, version 2.10m (Rohlf, 2000) แบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) เพื่อแสดงผลในรูปแบบ dendrogram และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2002) วิเคราะห์แบบ Neighbor-Joining (NJ) หาค่า Bootstrap ที่ 500 ซ้ำ แสดงผล ในรูป phylogram เพื่อใช้หาความสัมพันธ์ของสปีชีส์แต่ละตัวอย่าง

ผลการทดลองและวิจารณ์

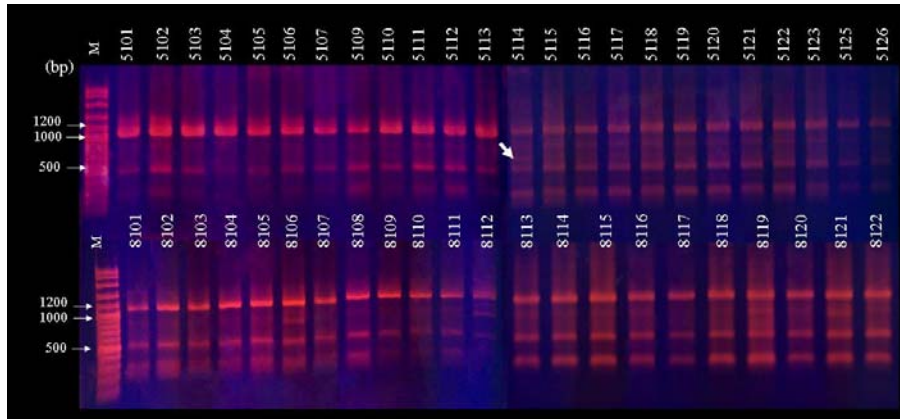
จากการคัดเลือกไพริเมอร์ที่เหมาะสมจากจำนวน 60 ไพริเมอร์ พบว่ามี 12 ไพริเมอร์ คิดเป็น 20% ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (ตาราง 1) โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด 64 แถบ มีขนาดอยู่ ระหว่าง 250-2,500 คู่เบส โดยที่ไพริเมอร์ 2 ชนิด คือ JAT-05 และ JAT-12 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ เหมือนกันในสปีชีส์ทุกตัวอย่าง (monomorphism) ขณะที่อีก 10 ไพริเมอร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง กัน (polymorphism)

ตาราง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 12 ชนิด

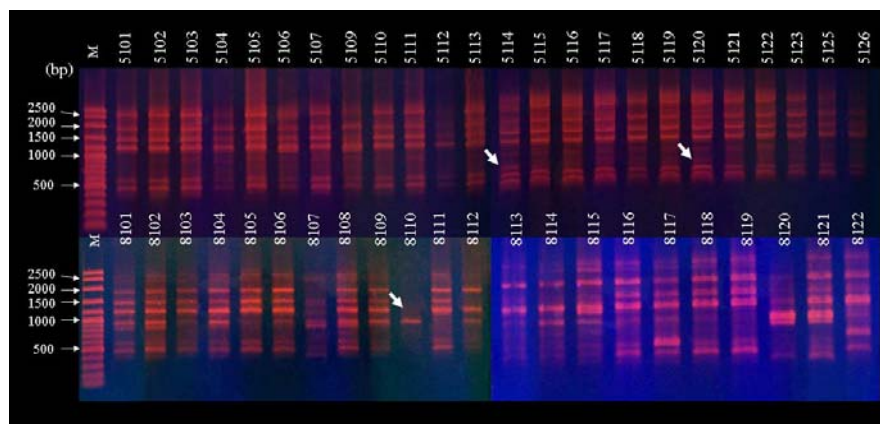
ลำดับ	ชนิดของไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
1	TSA-20	5'- GTTGGCGATCC -3'
2	TSC-02	5'- GTAAGGCGTC -3'
3	TSC-05	5'- GATGACCGCC -3'
4	JAT-04	5'- CGACGCGTGC -3'
5	JAT-05	5'- GGCCACAGCG -3'
6	JAT-06	5'- ACCCGTCCCC -3'
7	JAT-08	5'- AGTCAGCCAC -3'
8	JAT-10	5'- GGGTAACGCC -3'
9	JAT-12	5'- AAGCGACCTG -3'
10	JAT-19	5'- ACCAGGGCCA -3'
11	JAT-26	5'- TGCCGAGCTG -3'
12	JAT-29	5'- TTGGCACGGG -3'

จาก 10 ไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน มี 4 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ อาจใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายได้ และมีความคงที่ เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 3 ซ้ำ คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส จากไพรเมอร์ TSC-05 พบเฉพาะสับุ้ด้าหมายเลข 5114 (รูป 1) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส จากไพรเมอร์ JAT-04 พบเฉพาะสับุ้ด้าหมายเลข 5114 และ 5120 (รูป 2) และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส จากไพรเมอร์ JAT-19 พบเฉพาะสับุ้ด้าหมายเลข 8114 และ 8115 (รูป 3)

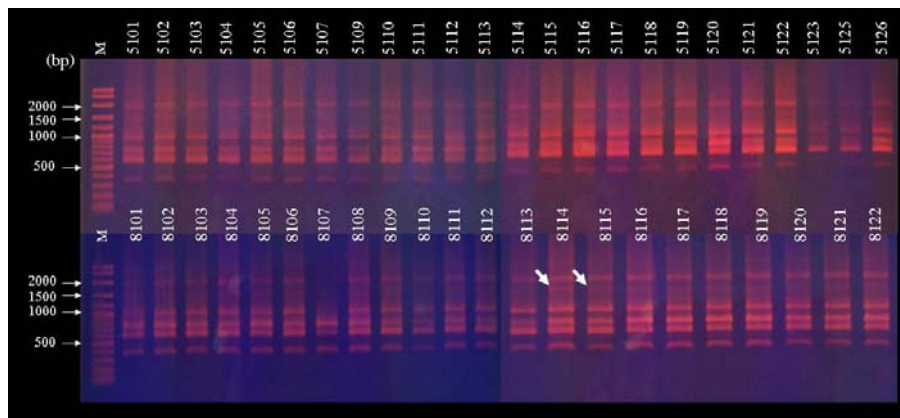
นอกจากนี้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส จากไพรเมอร์ TSC-02 ปรากฏเกือบทุกตัวอย่างของสับุ้ด้า ยกเว้นตัวอย่างหมายเลข 8113 (รูป 4) และชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบส จากไพรเมอร์ JAT-04 ปรากฏเกือบทุกตัวอย่างของสับุ้ด้า ยกเว้นสับุ้ด้าหมายเลข 8110 (รูป 2)



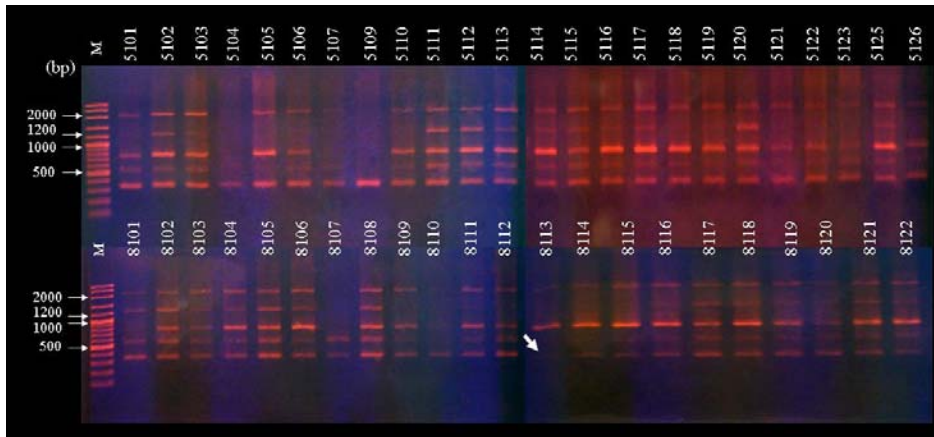
รูป 1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากวิธี RAPD ด้วยไพรเมอร์ TSC-05; M คือ 100 bp DNA ladder



รูป 2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากวิธี RAPD ด้วยไพรเมอร์ JAT-04; M คือ 100 bp DNA ladder



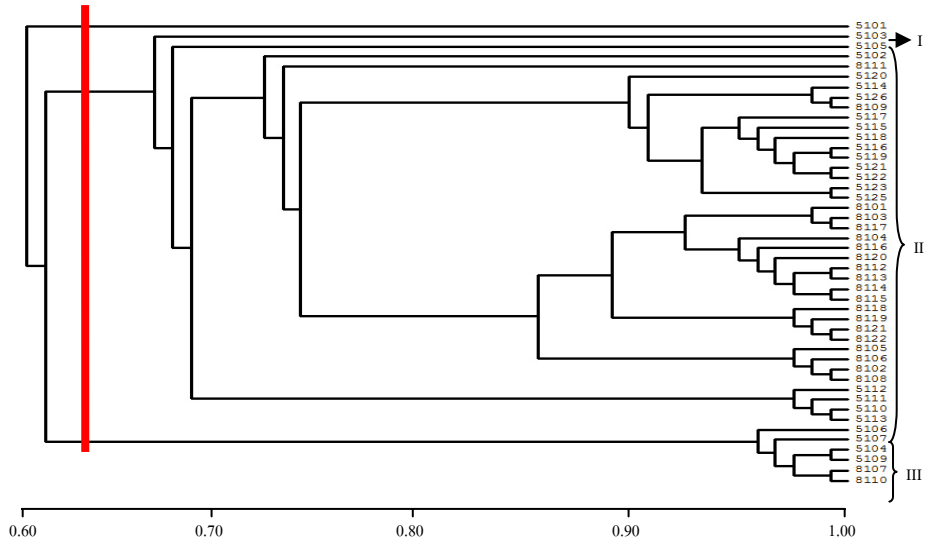
รูป 3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากวิธี RAPD ด้วยไพรเมอร์ JAT-19; M คือ 100 bp DNA ladder



รูป 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากวิธี RAPD ด้วยไพรเมอร์ TSC-02; M คือ 100 bp DNA ladder

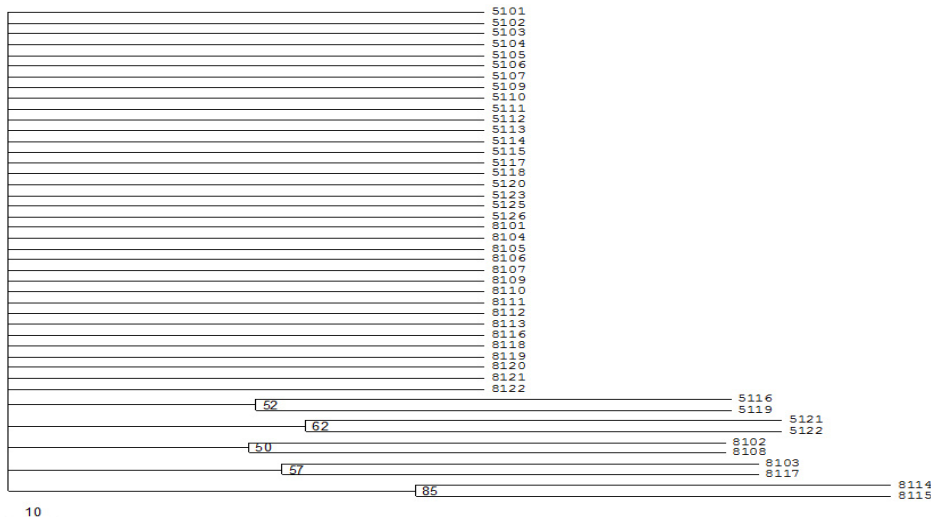
จากการคำนวณความเหมือนและความแตกต่างที่ละคู่สลับกันจนครบทุกตัวอย่าง พบว่ามีค่า similarity index อยู่ระหว่าง 0.5706-0.9881 โดยที่ตัวอย่างหมายเลข 5116 และ 5119 มีความเหมือนกันมากที่สุดและตัวอย่างหมายเลข 5125 และ 8114 มีความแตกต่างกันมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ในรูปของ dendrogram (รูป 5) พบว่าสามารถแบ่งสปีด้าออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสปีด้าหมายเลข 5101 เพียงตัวอย่างเดียว โดยมีดัชนีความเหมือนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 อยู่ระหว่าง 0.7147-0.9678 เมื่อพิจารณาจากทั้ง 10 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสปีด้า 39 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.5706-0.9881 ซึ่งภายในกลุ่มนี้ยังสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 สปีด้าหมายเลข 5103 เพียง 1 ตัวอย่าง กลุ่มย่อยที่ 2 สปีด้าหมายเลข 5105 เพียง 1 ตัวอย่างเช่นกัน กลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วยสปีด้า 33 ตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.5706-0.9881 โดยที่ตัวอย่าง 5116 และ 5119 มีความเหมือนกันมากที่สุด (0.9881) ขณะที่หมายเลข 5125 และ 8114 มีความเหมือนกันน้อยที่สุด (0.5706) และกลุ่มย่อยที่ 4 ประกอบด้วยสปีด้า 4 ตัวอย่าง คือ หมายเลข 5110, 5111, 5112 และ 5113 ซึ่งในกลุ่มตัวอย่างนี้มีค่าดัชนีความเหมือนกันมากถึง 0.8909-0.9464 และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสปีด้า 6 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.7230-0.9309 โดยภายในกลุ่มนี้ หมายเลข 5106 และ 5107 มีความเหมือนกันมากที่สุด (0.9309) ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า สปีด้าทั้งหมด 46 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความเหมือนที่ค่อนข้างสูง แสดงว่าความแตกต่างของสปีด้าในแต่ละตัวอย่างเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (สิริพร แจ่มสุทธีวัฒน์, 2544; กมลวรรณ ไกรทองสุข, 2545)



รูป 5 Dendrogram วิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA ตัวเลขในแฉวงแสดงสัดส่วนของความเหมือนกัน

เมื่อพิจารณาจาก phylogram (รูป 6) พบว่าสับชุดำทั้ง 46 ตัวอย่างไม่มีการจัดเป็นกลุ่มๆ จะพบเพียงความสัมพันธ์ของตัวอย่างหมายเลข 8114 และ 8115 ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 85 ซึ่งสอดคล้องกับค่า similarity index ที่คำนวณได้ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันระหว่างตัวอย่างหมายเลข 5121 และ 5122 ตัวอย่างหมายเลข 8103 และ 8117 ตัวอย่างหมายเลข 5116 และ 5119 ตัวอย่างหมายเลข 8102 และ 8108 โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 62, 57, 52 และ 50 ตามลำดับ ขณะที่ตัวอย่างอื่นๆ ไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้



รูป 6 Phylogram วิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-joining ตัวเลขภายในแสดงค่า bootstrap support

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสบู่ดำที่รวบรวมมาจากแหล่งปลูกในประเทศไทยมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันน้อย เพราะมีค่าดัชนีความเหมือน (Similarity index) ที่ค่อนข้างสูง (0.5706-0.9881) แต่ไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้เมื่อศึกษาจาก phylogram ซึ่งความแตกต่างนั้นอาจมาจากสภาพแวดล้อม ดินที่ใช้ปลูก การดูแลรักษา เป็นต้น นอกจากนี้สบู่ดำเป็นพืชผสมข้ามมีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดและกิ่งชำ (ชำนานู ฉัตรแก้ว, 2549) เมื่อนำไปปลูกยังที่ต่างๆ กัน ทำให้ต้นสบู่ดำในแต่ละที่มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในท้องถิ่นนั้นๆ ทำให้มีลักษณะบางอย่างแตกต่างกันไปบ้าง ซึ่งรูปแบบที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น การเปลี่ยนแปลงเบสใดเบสหนึ่ง ณ ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าไปจับ (primer annealing site) การเพิ่ม (insertion) การขาดหายไป (deletion) ของลำดับดีเอ็นเอ เป็นต้น (Williams *et al.*, 1990)

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 46 ตัวอย่าง ที่เก็บจากแหล่งรวบรวมสายพันธุ์ โดยมีลักษณะทางกายภาพ ทั้งลักษณะของดอก ใบ เมล็ด และผลเหมือนกัน จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ และยังไม่มีการระบุว่าเป็นพันธุ์ใด มีจำนวนผลต่อช่อเท่าไรและเปอร์เซ็นต์น้ำมันในเมล็ดเป็นเท่าใด เพราะยังอยู่ในช่วงทดสอบผลผลิต จึงมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยในการหาความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างและอาจจะได้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่จำเพาะในแต่ละตัวอย่างด้วย จากการศึกษาพบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของสบู่ดำด้วยวิธี CTAB ของ Meyer (1999) ให้ผลดีสำหรับพืชที่มีใบอ่อนสีน้ำตาลและมียาง โดยได้ปริมาณดีเอ็นเอมากและคุณภาพดี และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 60 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 12 ชนิด สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนจำนวน 64 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 250–2,500 คู่เบส และบางไพรเมอร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphism) และจำเพาะ (specific band) ในบางตัวอย่าง ขณะที่บางไพรเมอร์ไม่มีความแตกต่าง (monomorphism) ในแต่ละตัวอย่าง และผลจาก dendrogram และ phylogram ที่สร้างขึ้นชี้ให้เห็นว่าสบู่ดำในทุกตัวอย่างมีความแตกต่างกันบ้างพอสมควร (Similarity index = 0.5706-0.9881) โดยที่ตัวอย่าง 5101 จะมีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆ มากที่สุด ขณะที่บางตัวอย่างมีความแตกต่างกันน้อยมาก เมื่อศึกษาจาก dendrogram นอกจากนี้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างต่างๆ ปรากฏว่าไม่สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ได้ แสดงว่ายังมีความแตกต่างกันบ้าง แต่ยังไม่บอกถึงความสัมพันธ์ทั้งหมดไม่ได้ แม้ว่าบางตัวอย่างจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน อาจจะเนื่องจากข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์มีน้อยเกินไป จึงยังไม่สามารถนำมาใช้จัดกลุ่มได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่นครราชสีมา อำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา ในการอนุเคราะห์ตัวอย่างสับดูดา ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีและการจัดการที่ให้ทุนสนับสนุน และขอขอบคุณศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี และห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยพันธุศาสตร์และชีววิทยาโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่

เอกสารอ้างอิง

- กมลวรรณ ไกรทองสุข. (2545). การใช้เทคนิค FISH และ AFLP ในการศึกษาอีโนมของข้าวป่า (*Oryza spp.*). วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ชำนาญ ฉัตรแก้ว. (2549). สับดูดา พืชพลังงาน. ฟีนี ฟับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ.
- สิริพร แจ่มสุทธีวัฒน์. (2544). การจำแนกปอสาโดยเทคนิคพันธุศาสตร์โมเลกุล. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ หลวงนา. (2548). ปลูกพืชน้ำมันเพื่อสร้างพลังงานทดแทน. *วารสารการเกษตรราชภัฏ*, 4(1), 36-40.
- อนุสรณ์ กาญจนภักดิ์. (2548). น้ำมันสับดูดากับเครื่องยนต์ดีเซล. *วารสารวิชาการปริทัศน์*, 13(2), 9-13.
- Devos, K.M. and Gale, M.D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 84, 567-572.
- Faure, S., Noyer, J.L., Horry, J.P., Bakry, F., Lanaud, C. and Gonzalez-de-Leon, D. (1993). A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 517-526.
- Gübitz, G.M., Mittelbach, M. and Trabi, M. (1999). Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L.. *Bioresource Technology*, 67, 73-82.
- Kennard, W.C., Poetter, K., Dijkhuizen, A., Meglic, V., Staub, J.E. and Havey, M.J. (1994). Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 42-48.
- 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 lanatus* (Thunb.) Mansf.) germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 719-725.
- Lu, H.J. and Myers, G.O. (2002). Genetic relationships and discrimination of ten influential upland cotton varieties using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 325-331.

- Meyer, R. (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, 10, 391-399.
- Mohibbe, A.M., Waris, A. and Nahar, N.M. (2005). Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass and Bioenergy*, 29, 293-302.
- Nei, M. and Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5269-5273.
- Ohmori, T., Murata, M. and Motoyoshi, F. (1995). Identification of RAPD markers linked to the *Tm-2* locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 307-311.
- Openshaw, K. (2000). A review of *Jatropha curcas* : an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy*, 19, 1-15.
- Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-pc version 2.10m Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Setauket, N. Y.: Software.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K. and Ban, Y. (2002). A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 281-285.
- Wachira, F.N., Waugh, R., Hackett, C.A. and Powell, W. (1995). Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*, 38, 201-210.
- 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 markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.