ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่ | พืชไร่นา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเกษตร และเครื่องหมายดีเอ็นเอ

Genetic Diversity Assestment of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Based on Characters and DNA Markers

นามผู้วิจัย นายศิริศักดิ์ สุนทรยาตร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์ประภา ศรีพิจิตต์, D.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปิยะ กิตติภาดากุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเกษตร และเครื่องหมายดีเอ็นเอ

Genetic Diversity Assestment of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Based on Morpho-agronomic Characters and DNA Markers

โดย

นายศิริศักดิ์ สุนทรยาตร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (พืชไร่)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร 2557: การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเกษตร และเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ประภา ศรีพิจิตต์, D.Agr. 94 หน้า

สบู่ดำหรือ *Jatropha curcas* L. เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายในเขตร้อน และมีศักยภาพเป็นพืชพลังงาน การศึกษานี้ได้ประเมินความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมสบู่ดำที่เก็บรวบรวมจากทั่วประเทศไทย และจากประเทศอื่นอีก 6 ประเทศ ชนิดพืชใกล้เคียงจำนวน 4 ชนิดได้รับการศึกษาร่วมกับพันธุ์สบู่ดำเหล่านี้ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP และ ISSR ผลการทดลองพบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก โดยค่าความเหมือนกันทางพันธุกรรมของตัวอย่างสบู่ดำอยู่ในช่วง 0.84 ถึง 1.00 เฉลี่ยเท่ากับ 0.99 จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่าตัวอย่างสบู่ดำเกือบทั้งหมดจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 1 ในขณะที่ตัวอย่างสบู่ดำจากประเทศสหรัฐอเมริกาแยกออกมาเป็นกลุ่มที่ 2 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าควรจะมีการนำเข้าเชื้อพันธุกรรมจากประเทศอื่น โดยเฉพาะจากประเทศที่เป็นแหล่งกำเนิดของพืชชนิดนี้เพื่อเพิ่มความหลากหลายของฐานพันธุกรรมสบู่ดำในประเทศไทย จากการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำกับพืชใกล้เคียงจำนวน 4 ชนิด พบว่า *J. integerrima* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสบู่ดำมากที่สุด ในขณะที่ *J. gossypifolia* มีความห่างทางพันธุกรรมกับสบู่ดำมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ และลักษณะทางเกษตร 23 ลักษณะ ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสบู่ดำ พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายต่ำมาก โดยสามารถจำแนกสบู่ดำทั้งหมดได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยสบู่ดำส่วนใหญ่จำนวน 127 accession ในขณะที่กลุ่มที่สองประกอบด้วยสบู่ดำเพียง 1 accession คือ J23 จากการตรวจสอบลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำ พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายสูง จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะทางเกษตร พบว่าลักษณะผลผลิตเมล็ดต่อไร่มีสหสัมพันธ์ทางบวกกับทุกลักษณะ ยกเว้นลักษณะอายุวันออกดอก เมื่อนำข้อมูลลักษณะทางเกษตรไปวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) พบว่าองค์ประกอบหลักสององค์ประกอบแรกครอบคลุม 61.73% และ 10.13% (รวม 71.86%) ของความแปรปรวนทั้งหมด และจากกราฟ PCA 2 มิติแสดงให้เห็นว่า accession ต่าง ๆ ของสบู่ดำมีการกระจายตัว แต่ไม่สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามสบู่ดำบาง accession มีลักษณะเฉพาะบางอย่างที่สามารถแยกออกมาได้อย่างชัดเจน accession ที่น่าสนใจได้แก่ J117 ซึ่งมีลักษณะทางเกษตรที่ดีหลายอย่างและได้รับพิจารณาว่าเป็นเชื้อพันธุกรรมที่ดีเด่น

_____ / __ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sirisak Soontornyatrara 2014: Genetic Diversity Assestment of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Based on Morpho-agronomic Characters and DNA Markers. Doctor of Philosophy (Agronomy), Major Field: Agronomy , Department of Agronomy. Thesis Advisor: Associate Professor Prapa Sripichitt, D.Agr. 94 pages.

Physic nut or *Jatropha curcas* L. is an oil crop widely distributed in the tropics with biofuel crop potential. This study was conducted to assess the genetic diversity of *J. curcas* germplasm collected from throughout Thailand and from other six countries. Other four *Jatropha* species were included in this study using AFLP and ISSR markers. The results clearly showed that *J. curcas* germplasm was very low in genetic diversity. Genetic similarity values estimated between *J. curcas* ranged from 0.8428 to 1.00 with an average of 0.9955. The result from UPGMA cluster analysis showed that almost all *J. curcas* samples were grouped into cluster 1, while a sample from USA formed separated cluster 2. This result indicated that the germplasms from other countries, preferably from the center of origin of this species, should be introduced to broaden genetic diversity of *J. curcas* in Thailand. The genetic relationship between *J. curcas* and other four related species was also observed. The result showed that *J. integerrima* was genetically more close to *J. curcas* than the others, while the highest value of genetic distance was found between *J. curcas* and *J. gossypifolia*. In addition, The genetic diversity of *J. curcas* germplasm was also evaluated by 8 morphological and 23 agronomical characters. The results on morphological characterization showed that germplasm had extremely low diversity. All samples could be divided into two groups. Almost all samples (127 accessions) were clustered into group 1, while sample no. J23 was formed separated group 2. Based on agronomic characterization, *J. curcas* germplasm had high diversity. Correlation analysis of the agronomic characters was also performed and the results indicated that the characters of the seed yield had positive correlation with all characters, except the number of days to flowering. The data on agronomic characters was subjected to principle component analysis (PCA). The first two principle components accounted for 61.73% and 10.13% (a total of 71.86%) of the total variation. The PCA two dimensional graph showed that most of the accessions were scattered and could not be clearly identified as group. However, some accessions which had unique characteristics were obviously distinguished. Interestingly, the accession no. J117 had several good agronomic characteristics and was considered to be a promising germplasm variety.

_____ _____ ____ / ____ / ____

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประภา ศรีพิจิตต์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยกำกับดูแล และให้การสนับสนุนการทำงานวิจัยให้สำเร็จเรียบร้อยเป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำ แนวทางในการวิเคราะห์ข้อมูล และสรุปผลการทดลองให้มีความสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา หงษ์ตระกูล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำด้านแนวทางและเทคนิคในการปฏิบัติงานด้านการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณคุณแอนนา สายมณีรัตน์ ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อพันธุกรรมสบู่ดำ ขอขอบใจคุณเมทินี กลัดมุข รวมทั้งนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาประจำห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพันธุศาสตร์และภาควิชาพืชไร่นาที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร

กรกฎาคม 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	41
ผลและวิจารณ์	57
ผล	57
วิจารณ์	72
สรุปและข้อเสนอแนะ	78
สรุป	78
ข้อเสนอแนะ	78
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	79
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	94

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	ตัวอย่างที่ใช้ในงานทดลอง	34
2	ลำดับเบสของ adapter ที่ใช้ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	48
3	ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	48
4	ลำดับเบสของไพรเมอร์+1 ที่ใช้ในการทำ preselective amplification ของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชุดที่ 1	49
5	ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในการทำ preselective amplification	50
6	ลำดับเบสของไพรเมอร์ + 3 ที่ใช้ในการทำ selective amplification	51
7	ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในการทำ selective amplification	52
8	ลำดับเบสของไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ในการทดลอง	53
9	ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเทคนิค ISSR	54
10	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่าง และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ จากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอสบู่ดำและพืชชนิดใกล้เคียง 4 ชนิด โดยใช้เทคนิค AFLP	58
11	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่าง และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ จากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอสบู่ดำและพืชชนิดใกล้เคียง 4 ชนิด โดยใช้เทคนิค ISSR	59
12	ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำกับพืชชนิดใกล้เคียง 4 ชนิด	61
13	ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำ 128 accession	64
14	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางเกษตร 23 ลักษณะของสบู่ดำ 128 accession	66

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 ส่วนต่าง ๆ ของต้นสบู่ดำ 6

2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ(วงกลมสีชมพู) และ พืชชนิดใกล้เคียง 4 ชนิด(วงกลมสีน้ำตาล) ด้วยวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) โดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP และ ISSR 62

3 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP และ ISSR ซึ่งแบ่งตัวอย่างสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (วงกลมสีน้ำเงิน) และกลุ่มที่ 2 (วงกลมสีแดง) 62

4 กราฟสองมิติแสดงการกระจายตัวของสบู่ดำ 128 accession จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) โดยอาศัยข้อมูลลักษณะทางเกษตร 23 ลักษณะ 71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLPs	=	Amplified Fragment Length Polymorphisms
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxynucleotide triphosphate
ISSR	=	Inter Simple Sequence Repeat
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pH	=	Power of hydrogen ion
RAPDs	=	Random Amplified Polymorphic DNAs
RFLPs	=	Restriction Fragment Length Polymorphisms
SSRs	=	Simple Sequence Repeats
SSCPs	=	Single Strand Conformational Polymorphisms

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเกษตร และเครื่องหมายดีเอ็นเอ

Genetic Diversity Assestment of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Based on Morpho-agronomic Characters and DNA Markers

คำนำ

น้ำมันเชื้อเพลิงเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญที่สุดของประเทศไทย ซึ่งต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศเกือบทั้งหมด คิดเป็นมูลค่าหลายแสนล้านบาท โดยในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงระหว่างเดือนมกราคม-พฤศจิกายน 2555 คิดเป็นมูลค่า 1.096 ล้านล้านบาท หรือเฉลี่ยนำเข้าปริมาณน้ำมัน 9.29 แสนบาร์เรลต่อวัน (กรมธุรกิจพลังงาน, 2556) และนับวันความต้องการใช้น้ำมันมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปีตามการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศ โดยมีอัตราการใช้น้ำมันเพิ่มขึ้นเฉลี่ยปีละ 11.7 % (สำนักนโยบายและแผนพลังงาน, 2550) ประกอบกับราคาน้ำมันต่อหน่วยก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้ประเทศไทยต้องสูญเสียเงินตราต่างประเทศเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้แหล่งน้ำมันตามธรรมชาติก็มีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ โดยจะหมดไปภายใน 40-50 ปีข้างหน้า (นินนาท, 2548) เพื่อแก้ปัญหาวิกฤตด้านพลังงานของประเทศไทย จึงมีความพยายามที่จะหาพลังงานจากแหล่งอื่นมาทดแทนพลังงานจากน้ำมัน เช่น พลังงานจากน้ำ พลังงานจากลม พลังงานจากแสงอาทิตย์ และพลังงานจากชีวมวล (biofuel) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลังงานจากชีวมวลซึ่งเป็นพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพสูง เนื่องจากพลังงานจากชีวมวลส่วนใหญ่ได้มาจากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ปาล์มน้ำมัน และสบู่ดำ (พิสมัย, 2551) ซึ่งประเทศไทยมีความพร้อมในการผลิตพืชเหล่านี้ทั้งในด้านพื้นที่ปลูกและด้านเทคโนโลยีการผลิต

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้ เนื่องจากสบู่ดำเป็นพืชที่มีปริมาณน้ำมันในเมล็ดค่อนข้างสูงประมาณ 46-58 % ของเนื้อในเมล็ด (kernel) หรือ 30-40 % ของเมล็ดทั้งเปลือก (seed) (Subramanian *et al*., 2005) โดยเมล็ดสบู่ดำ 4 กิโลกรัมจะสกัดน้ำมันได้ 1 ลิตร (ไพจิตร, 2530) และน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลในเครื่องยนต์การเกษตรได้ถึง 100 % โดยไม่ต้องใช้น้ำมันอื่นผสม (สุขสันต์, 2551) ซึ่งจะทำให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนในการผลิตสินค้าเกษตรได้มาก นอกจากนี้กากเมล็ด (seed cake) ของสบู่ดำที่ได้จากการสกัดน้ำมันยังสามารถนำไปทำเป็นปุ๋ยได้ดีเนื่องจากมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธาตุอาหารสูง แต่น้ำมันสบู่ดำมีสารพิษที่เรียกว่า phorbal esters ซึ่งเป็นอันตรายต่อการบริโภคของคนและสัตว์ (Gubitz *et al*., 1999) ดังนั้นการปลูกสบู่ดำเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนจึงไม่มีผลกระทบต่อปริมาณน้ำมันที่ใช้บริโภค

สบู่ดำเป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกากลาง (Openshaw, 2000) และนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดยชาวโปรตุเกสในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยาเพื่อนำเมล็ดมาบีบน้ำมันสำหรับทำสบู่และใช้จุดไฟให้แสงสว่างเวลากลางคืน (ชำนาญ, 2549) ต่อมาได้มีการปลูกพืชชนิดนี้อย่างแพร่หลายในทุกภาคของประเทศไทย แต่ยังไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จากวิกฤตด้านพลังงานน้ำมันที่เกิดขึ้นในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2549 รัฐบาลจึงได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกสบู่ดำตามหัวไร่ปลายนาเพื่อนำเมล็ดสบู่ดำไปสกัดน้ำมันสำหรับใช้กับเครื่องยนต์การเกษตรต่าง ๆ เช่น รถไถเดินตาม เครื่องสูบน้ำ แต่ในการปลูกสบู่ดำนั้น เกษตรกรยังขาดแคลนพันธุ์สบู่ดำที่ดีซึ่งสามารถให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันที่สูง โดยสบู่ดำที่มีอยู่ในปัจจุบันให้ผลผลิตต่ำมาก ประมาณ 100-150 กิโลกรัมต่อไร่ (วิมลรัตน์ และคณะ, 2534) นอกจากนี้การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิต และปริมาณน้ำมันยังมีการทำน้อยมาก

การรวบรวมพันธุ์สบู่ดำจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยศึกษาทั้งด้านความแตกต่างของลักษณะภายนอก (phenotype) และความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาจัดจำแนกสบู่ดำออกเป็นกลุ่ม จะช่วยทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถใช้พันธุ์สบู่ดำที่รวบรวมได้เป็นแหล่งพันธุกรรม และใช้ข้อมูลจากการจัดกลุ่มสบู่ดำในการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่เพื่อผสมพันธุ์และพัฒนาพันธุ์สบู่ดำที่ให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันที่สูง สำหรับใช้เป็นพันธุ์แนะนำให้เกษตรกรปลูกต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเกษตร และลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP และ ISSR

2. เพื่อจัดจำแนกสบู่ดำออกเป็นกลุ่มโดยอาศัยข้อมูลความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (genetic similarity) ในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเกษตร และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

สบู่ดำเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับมันสำปะหลัง และยางพารา สบู่ดำมีชื่อสามัญว่า physic nut หรือ purging nut นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปในแต่ละประเทศอีกด้วย เช่น pourghere, pignon d'Inde (ฝรั่งเศส) purgeernoot (เนเธอร์แลนด์) purgueira (โปรตุเกส) fagiola d'India (อิตาลี) kadam (เนปาล) yu-lu-tzu (จีน) tubang-bakod (ฟิลิปปินส์) jarak budge (อินโดนีเซีย) bagani (ไอเวอร์รีโคสต์) butuje (ไนจีเรีย) pinoncillo (เม็กซิโก) template (คอสตาริกา) mundubi-assu (บราซิล) pinol (เปรู) และ pinon (กัวเตมาลา) ส่วนในประเทศไทยก็มีการเรียกชื่อสบู่ดำที่แตกต่างกันไปในแต่ละภาค เช่น ภาคเหนือเรียกว่า มะหุ่งฮั้ว ไท้-ยู หรือเกงยู ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า มะเยา มักเย้า หรือสีหลอด ส่วนภาคใต้เรียกว่า หงษ์เทศ และภาษายาวีเรียกว่า ยาเคาะ เป็นต้น (ชำนาญ, 2549) สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. คำว่า Jatropha มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก 2 คำคือ jatros แปลว่าแพทย์ (doctor) และ trophe แปลว่าอาหาร (food) ซึ่งมีความหมายว่าสบู่ดำสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค (medicine) ส่วนคำว่า curcas เป็นชื่อสามัญที่รู้จักกันทั่วไปของสบู่ดำในเมือง Malabar ของประเทศอินเดีย (Heller, 1996)

สบู่ดำเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Jatropha* ซึ่งพืชในสกุลนี้มีจำนวนประมาณ 175 ชนิด (species) ตัวอย่างเช่น *J. aconitifolia* ที่พบมากในเขตมายา (Maya) ซึ่งในทางตอนใต้ของประเทศเม็กซิโกมีการนำพืชชนิดนี้ไปต้มเพื่อรับประทาน *J. cuneata* ที่พบในเขตเมืองของประเทศเม็กซิโกมีการนำส่วนของลำต้นไปสานเป็นตะกร้าและถาด (Johnton, 1997) พืชในสกุล *Jatropha* ที่พบในประเทศไทยมีหลายชนิด เช่น สบู่แดง (*J. gossypifolia* L.) เป็นพืชที่มีลักษณะใบสีน้ำตาลปนแดงขึ้นอยู่ทั่วไปบริเวณที่แห้งแล้ง ฝิ่นต้น (*J. multifida* L.) หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica* Hook.) และปัตตาเวีย (*J. integerrima* Jacq.) ซึ่งเป็นพืชที่นิยมนำมาปลูกประดับตามบ้านเรือนเนื่องจากมีทรงต้น ใบ และดอกที่สวยงาม**(องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2556)**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ

สบู่ดำเป็นพืชดิพลอยด์ (diploid) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 22 (Soontornchainaksaeng and Jenjittikul, 2003) สบู่ดำมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ภาพที่ 1) ดังนี้

ลำต้น สบู่ดำเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูงประมาณ 6 เมตร มีอายุไม่น้อยกว่า 20 ปี ทรงพุ่มมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เมตร ยอดและใบอ่อนมีสีเขียวแกมม่วง ลำต้นอ่อนมีสีเขียว ผิวเรียบอวบน้ำ เปราะหักง่ายเพราะเป็นไม้เนื้ออ่อน ไม่มีแก่น (Heller, 1996) เมื่อสบู่ดำอายุมากขึ้นโคนต้นมีสีน้ำตาลอมเทาและเริ่มแตกทรงพุ่มเมื่อลำต้นมีความสูงจากระดับพื้นดินประมาณ 12 เซนติเมตร ลำต้นมีการเจริญเติบโตแบบแตกกิ่งแขนง หากมีการหักของลำต้นอ่อน กิ่งแขนงหรือก้านใบจะมีน้ำยาง (latex) ที่มีลักษณะใส ไม่มีสีไหลออกมา ในลำต้นแก่จะพบน้ำยางเฉพาะที่เปลือกเท่านั้น

ราก สบู่ดำที่เพาะจากเมล็ดจะมีรากแก้ว ในระยะ 14 วันแรกจะมีรากงอกออกจากเมล็ด 5 ราก โดยรากจำนวน 4 รากจะแยกออกมาจากรากที่ 1 เมื่อต้นสบู่ดำมีอายุมากขึ้นจะมีรากฝอยกระจายออกโดยรอบตามขนาดทรงพุ่ม มีรัศมีจากโคนต้นออกไปประมาณ 1-2 เมตรขึ้นไป สบู่ดำที่ขยายพันธุ์ด้วยส่วนอื่น ๆ ที่มิใช่เมล็ดจะไม่มีรากแก้ว (พรชัย, 2549)

ใบ เป็นแบบใบเดี่ยว ยอดและใบอ่อนมีสีเขียวแกมม่วง แผ่นใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) ถึงรูปโล่ (palmately compound) มีลักษณะคล้ายใบพุดตานหรือใบฝ้าย แต่หนากว่าเพราะมีไข (cutin) เคลือบอยู่ที่ผิวใบ ขอบใบมีรอยหยัก (lobe) 5-7 หยัก ฐานใบกว้าง การจัดเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบร่างแห (palmately netted vienation) แผ่นใบมีสีเขียว ขนาดของแผ่นใบมีความยาวและกว้างระหว่าง 6-15 เซนติเมตร ก้านใบสีเขียว ความยาวก้านใบประมาณ 5.0 เซนติเมตร การเกิดใบจะเกิดสลับกันบนกิ่งและ จะทิ้งใบในฤดูแล้ง (กรีก, 2549)

ช่อดอกและดอก ช่อดอก (inflorescence) จะออกบริเวณซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ช่อดอกเป็นแบบ cyme ชนิด compound dichasia ดอกสบู่ดำเป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ (incomplete flower) ดอกตัวผู้ (staminate flower) และดอกตัวเมีย (pistillate flower) แยกอยู่กันคนละดอกแต่อยู่ภายในช่อดอกเดียวกันเรียกว่า monoecious หนึ่งช่อดอกจะประกอบด้วยช่อดอกย่อยซึ่งจะมีดอกตัวเมีย 1 ดอก ช่อดอกมีความยาวระหว่าง 6-10 เซนติเมตร ก้านของช่อดอกมีใบประดับขนาดเล็กซึ่งมีรูปทรงใบเป็นแบบใบหอก (lanceolate) มีขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม ฐานใบกว้าง ส่วนรูปทรงดอกของสบู่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดำมีรูปทรงคล้ายถ้วย ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียมีกลีบเลี้ยงจำนวน 5 กลีบ โคนกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉก รูปไข่ มีสีเหลืองแกมเขียว ปลายมน โคนกลีบด้านในมีขนยาว และแต่ละดอกมีกลีบดอกจำนวน 5 กลีบ มีสีเหลืองอมขาว มีต่อมน้ำหวานติดอยู่ที่โคนของกลีบดอกด้านใน ดอกตัวผู้มีเกสรตัวผู้ (stamen) จำนวน 10 อัน แบ่งออกเป็น 2 วง วงละ 5 อัน วงนอกโคนก้านเกสรจะแยกออกจากกัน แต่โคนก้านเกสรวงในจะเชื่อมติดกัน ปลายก้านเกสรตัวผู้มีอับเรณู (anther) ยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร มีสีเหลือง ดอกตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้และอยู่ตรงกลางของช่อดอกย่อย กลีบดอกมีรูปทรงแบบขอบขนาน มีสีเขียวอ่อน ภายในดอกมีเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน

ภาพที่ 1 ส่วนต่าง ๆ ของต้นสบู่ดำ: a-ปลายยอดและช่อดอก, b-เปลือก, c-แผ่นใบและการเรียงตัวของเส้นใบ, d-ดอกตัวเมีย, e-ดอกตัวผู้, f-ภาพตัดตามขวางของผลอ่อน, g-ลักษณะของผลสุกแก่, h-ภาพตัดตามยาวของผล และ i-เมล็ด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผล มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรูปกระสวย มี 3-4 พู (lodicule) เส้นผ่าศูนย์กลางของผลยาวประมาณ 3.0 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียว ผลสุกมีสีเหลือง และเมื่อแก่จัดเปลือกนอกสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีดำในที่สุด ผลแห้งที่ยังติดอยู่บนต้นจะไม่แตกออก เมื่อแกะผนังด้านนอก (exocarp) และผนังชั้นกลาง (mesocarp) ของผลออกจะพบผนังชั้นใน (endocarp) สานกันเป็นชั้นหุ้มเมล็ดไว้ ภายในหนึ่งผลมีจำนวนเมล็ด 2-4 เมล็ด แต่ส่วนมากพบว่ามีจำนวน 3 เมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ดมีลักษณะแข็ง (nut) การเจริญเติบโตของผลสบู่ดำเริ่มตั้งแต่ออกดอกจนถึงสุกแก่ใช้เวลาประมาณ 60–90 วัน (Michael, 2006)

เมล็ด มีรูปทรงป้อมยาว (oblong) เปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ ผิวเรียบเป็นมัน แต่เมื่อผิวแห้งจะมีรอยแตกร่อน เมื่อสัมผัสจะรู้สึกว่ามีความหยาบ เมล็ดจัดเป็นพวกมีเยื่อหุ้มเมล็ด (albuminous seed) โดยเยื่อหุ้ม (albumin) บุอยู่ภายในเป็นที่เก็บสะสมน้ำมัน (oil หรือ fat) และสารเคอร์ซิน (curcin) ส่วนของเนื้อในเมล็ด (kernel) มีสีขาว และคัพภะ (embryo) อยู่ภายในเมล็ด เมล็ดประกอบด้วยเนื้อเมล็ดสีขาว (albumen หรือ kernel) ประมาณ 32% และเปลือกมีค่าอยู่ระหว่าง 30-38% ของน้ำหนักเมล็ด เมล็ดสบู่ดำไม่มีการพักตัว (Henning, 2004) เมล็ดสบู่ดำในระยะสุกแก่เก็บเกี่ยวมีองค์ประกอบภายในเมล็ดที่สำคัญดังนี้ ความชื้นประมาณ 18% โปรตีน 18.6% ไขมัน 38.0% คาร์โบไฮเดรต 17% เยื่อใย 15.5% และเถ้า 5.3% (ระพีพันธุ์ และสุขสันต์, 2546)

กำเนิดและการกระจายตัวของสบู่ดำ

สบู่ดำมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเม็กซิโกและประเทศในทวีปอเมริกากลางได้แก่ Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua และ Panama ซึ่งบริเวณดังกล่าวมีสบู่ดำที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในป่าและแถบชายฝั่งทะเลจำนวนมาก อย่างไรก็ตามมีบันทึกจำนวนมากกล่าวว่าสบู่ดำมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบทะเล Caribbean ได้แก่ Bahamas, Cuba, Dominica, Dominican Republic, Haiti, Puerto Rico, Saint Lucia, Santo Domingo และ Trinidad ส่วนประเทศในทวีปอเมริกาใต้ ได้แก่ Argentina, Bolivia, Brazil, Columbia, Ecuador, Paraguay, Peru และ Venezuela พบสบู่ดำไม่มากนัก อย่างไรก็ตามถิ่นกำเนิดที่แท้จริงของสบู่ดำจะต้องมีการสืบค้นต่อไป (Heller, 1996) ต่อมาได้มีการนำสบู่ดำไปปลูกในรัฐ Florida ประเทศสหรัฐอเมริกา และสบู่ดำจากประเทศในแถบทะเล Caribbean ได้แพร่กระจายไปยังประเทศอื่น ๆ ในทวีปแอฟริกา และเอเชียโดยนักเดินเรือชาวโปรตุเกส โดยผ่านทางหมู่เกาะ Cape Verde และ Guinea Bissau ในทวีป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอเชียสบู่ดำได้แพร่กระจายไปยังประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และจีน โดยปลูกเพื่อนำน้ำมันจากเมล็ดไปใช้ประโยชน์ (Heller, 1996; Gübitz *et al*., 1999)

สำหรับประเทศไทยได้มีการนำสบู่ดำเข้ามาปลูก ในปลายสมัยกรุงศรีอยุธยาประมาณ 300 ปีที่ผ่านมา โดยพ่อค้านักเดินเรือชาวโปรตุเกสเพื่อนำเมล็ดมาบีบน้ำมันสำหรับทำสบู่ ปัจจุบันสบู่ดำมีปลูกอยู่ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น ภาคกลางเรียกสบู่ดำ เพราะเมล็ดเป็นสีดำ ภาคเหนือเรียกมะหุ่งฮั้วเนื่องจากนำมาปลูกเป็นรั้วธรรมชาติใช้ป้องกันสัตว์เข้ามากัดกินทำลายพืชที่ปลูกเพราะไม่ชอบกลิ่นเหม็นเขียว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกมะเยา แต่ชาวโคราชเรียกว่าสีหลอดเพราะถ้ารับประทานแล้วจะเกิดอาการท้องเดินเหมือนสลอด เนื่องจากมีกรดไฮโดรไซยานิค แต่สารนี้จะสลายตัวไปเมื่อถูกความร้อน ภาคใต้เรียกหงเทศซึ่งหมายถึงละหุ่งที่นำเข้าจากต่างประเทศ (ระพีพันธ์ และสุขสันต์, 2546)

นิเวศวิทยาของสบู่ดำ

สบู่ดำที่ขึ้นอยู่ในธรรมชาติพบอยู่ระหว่างละติจูด (latitude) ที่ 28°N-30°S และที่ความสูง (altitude) ระหว่าง 7-1,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล (Kiefer, 1986) สบู่ดำเป็นพืชที่มีการปรับตัวและเจริญเติบโตได้ในดินเกือบทุกชนิดเช่น ดินกรวด ดินทราย ดินกรด และดินด่าง ซึ่งรวมถึงดินที่มีธาตุอาหารปริมาณต่ำ ระดับความเป็นกรดเป็นด่างของดินอยู่ระหว่าง 5.5-8.5 สบู่ดำเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีการระบายน้ำและอากาศดี มักพบต้นสบู่ดำขึ้นอยู่บริเวณสภาพดินที่มีหินขนาดเล็กปนอยู่จำนวนมาก ที่เรียกว่า “ribeiras” และบนเขาที่เป็นหินที่มีความลาดชัน สบู่ดำเจริญเติบโตได้แม้แต่ในร่องแตก (cracks) และรอยแยก (crevices) ของหิน แม้แต่ดินที่มีคุณสมบัติต่ำมากสบู่ดำก็สามารถเจริญเติบโตได้โดยไม่ต้องมีการไถพรวน จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้สบู่ดำสามารถเจริญเติบโตและแพร่กระจายไปอย่างกว้างขวาง แม้ในดินที่มีสภาพไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชชนิดอื่นก็ตาม สบู่ดำที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดจะสามารถเจริญเติบโตได้ในดินที่มีความหนาแน่นมาก แต่การเกิดรากจะมีจำนวนลดลง ถึงแม้สบู่ดำจะเป็นพืชที่มีการปรับตัวได้ดี ต้นสบู่ดำที่จะทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดีนั้นต้องเป็นต้นสบู่ที่เจริญเติบโตจากเมล็ดและอยู่ในพื้นที่ที่ไม่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินซึ่งอยู่ในเขตแห้งแล้ง (Heller,1996)

สบู่ดำเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Jatropha* ซึ่งพืชในสกุลนี้ ส่วนใหญ่เจริญเติบโตอยู่ในเขตแห้งแล้ง เช่น ทุ่งหญ้าสวันน่า พืชในสกุลนี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน คือ อวบน้ำ ใบร่วงในฤดูแล้งถึงแม้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สบู่ดำจะมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแห้งแล้งหรือกึ่งแล้งได้ก็ตาม (Dehgan and Schutman, 1994) สบู่ดำเป็นพืชที่มีความทนทานและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแห้งแล้งได้ดี แม้บางพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนต่ำเพียง 300-1,000 มิลลิเมตรต่อปี เช่น Cape Verde และ Mali เป็นต้น (Joker and Jepsen, 2003) ในปัจจุบันมีการนำต้นสบู่ดำที่มีความทนทานต่อสภาพฝนแล้งข้ามปีใน Cape Verde ไปปลูกในเขตแห้งแล้ง พื้นที่ที่เป็นถิ่นกำเนิดของสบู่ดำมีอุณหภูมิระหว่าง 20-28 องศาเซลเซียส แต่สบู่ดำสามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่มีอุณหภูมิระหว่าง 11-28 องศาเซลเซียสได้ และมีความทนทานต่อสภาพน้ำค้างแข็งได้เล็กน้อย ซึ่งพบในเขต Cha das Calderas และ Fogo (Kiefer, 1986) และพบว่าต้นสบู่ดำสามารถเจริญเติบโตได้ในเขตกึ่งร้อน (subtropical) ซึ่งมีอากาศหนาวได้ และในเขตร้อน (tropical) ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีอุณหภูมิสูงสบู่ดำก็สามารถปรับตัวได้ดีมีความทนทานต่อสภาพอากาศร้อนและแล้งได้ดี อย่างไรก็ตามสบู่ดำสามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ว่าในพื้นที่ปลูกจะมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศบ่อยมาก สบู่ดำไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง (photoperiod) จึงทำให้สบู่ดำมีการเจริญเติบโตและออกดอกได้ตลอดปี (Heller, 1996) และให้ผลผลิตเฉลี่ยตลอดปีประมาณ 2-4 กิโลกรัม/ต้น อย่างไรก็ตามสบู่ดำอาจให้ผลผลิตสูงมากกว่านี้ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุของต้น สภาพแวดล้อมที่ปลูก การดูแลรักษาและวิธีการปลูกที่เหมาะสม โดยสามารถให้ผลผลิตได้ตั้งแต่ปีแรก และให้ผลผลิตสูงสุดเมื่ออายุประมาณ 3-5 ปี (Francis *et al*., 2005)

การใช้ประโยชน์สบู่ดำ

ส่วนต่าง ๆ ของต้นสบู่ดำสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. ใช้เป็นยา กิ่งแขนงของต้นสบู่ดำใช้ทำแปรงสีฟันและน้ำยางจากกิ่งแขนงจะช่วยรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคฟันและเลือดออกตามไรฟัน เถ้าที่ได้จากการเผาไหม้ของกิ่งก้านและลำต้นใช้เป็นผงยาสีฟัน เถ้าของกิ่งก้านและลำต้นของสบู่ดำผสมกับเถ้าของ Blumea ใช้ทาเพื่อบรรเทาอาการเจ็บปวดอันเนื่องมาจากการเป็นริดสีดวงทวารหนัก และถ้าใช้เถ้าของสบู่ดำกับเถ้าของ Blumea ผสมกับน้ำมันมัสตาร์ดใช้ทาแก้อาการปวดที่เกิดจากโรค rheumatism น้ำยางที่สกัดจากก้านใบมีฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงพยาธิวิทยาของเซลล์เชื้อ HIV ได้ และมีความเป็นพิษต่อผู้ใช้ต่ำ น้ำยางสบู่ดำเข้มข้น 100% และ 50% สามารถฆ่าไข่หนอนของพยาธิไส้เดือนและพยาธิปากขอที่อุณหภูมิห้องได้ สารแทนนิน (tannin) ที่ได้จากเปลือกของลำต้นสบู่ดำใช้เป็นยาถ่าย ยาขับหนอนพยาธิ แก้ปวดท้อง น้ำที่สกัดจากเปลือกของลำต้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราบางชนิด ส่วนของใบสบู่ดำใช้เป็นยาถอนพิษ แก้ตัวร้อน แก้พิษซางตาน ปากเปื่อย และลิ้นพุพอง ชาวบ้านในชนบทใช้ส่วนต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของสบู่ดำ เป็นสมุนไพรรักษาโรคต่าง ๆ ตามภูมิปัญญาของบรรพบุรุษที่เล่าสืบต่อกันมา เช่น ใช้น้ำยางใสป้ายริมฝีปากรักษาโรคปากนกกระจอกและรักษาแผลในปาก แก้อาการปวดฟัน แต่ถ้านำน้ำยางมาผสมกับน้ำนมมารดาป้ายลิ้นแก้ลิ้นเป็นฝ้าได้ รักษาโรคตาแดง หรือผสมน้ำทำเป็นยาระบาย ส่วนของลำต้นนำมาผ่าหรือสับเป็นท่อนแช่น้ำอาบรักษาโรคซางในเด็ก รักษาอาการคันตามผิวหนัง หรือนำใบของสบู่ดำห่อข้าวสุกแล้วหมกขี้เถ้าในเตาแล้วนำมาให้เด็กรับประทานเพื่อรักษาโรคตาแฉะ หรือนำมาห่ออิฐร้อนแล้วนำมานาบบริเวณท้องผู้หญิงหลังคลอดบุตร (ประโยชน์, 2549)

2. ใช้เป็นอาหาร ส่วนของใบหรือยอดอ่อนสบู่ดำเมื่อนำไปนึ่งด้วยไอน้ำร้อน เพื่อทำลายกรดไฮโดรไซยานิคซึ่งเป็นสารพิษ จะสามารถนำไปรับประทานได้ กากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านความร้อนแล้วสามารถนำไปเป็นอาหารสัตว์ได้ ในประเทศเม็กซิโกมีการนำเมล็ดมาคั่วหรือต้มเพื่อสลายสารพิษก่อนรับประทาน (Torre-Cuadros *et al*., 2003)

3. ใช้เป็นเชื้อเพลิง สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันโดยน้ำมันที่ได้จากการสกัดเมล็ดของสบู่ดำด้วยตัวทำละลายอีเธอร์ ให้ปริมาณน้ำมัน 43.96 % จากทั้งเมล็ด (whole seed) และ 54.68% จากเนื้อในเมล็ด (kernel) (Henning, 2009) น้ำมันสบู่ดำประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) 78.72% และกรดไขมันชนิดอิ่มตัว(saturated fatty acid) 21.28% (ระพีพันธุ์, 2544) ซึ่งไขมันทั้งสองชนิดนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ ดังนี้ ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 มีการนำน้ำมันสบู่ดำมาใช้กับตะเกียงให้แสงสว่างเวลากลางคืนโดยชาวบ้านในจังหวัดนครราชสีมาได้นำเมล็ดสบู่ดำมาตำและบรรจุลงในกระบอกไม้ไผ่แล้วใช้ด้ายดิบทำเป็นไส้ใช้จุดแทนเทียนไขได้ หรือนำเมล็ดไปเสียบที่ปลายก้านแท่งโลหะจุดให้แสงสว่างได้ น้ำมันสบู่ดำใช้เป็นเชื้อเพลิงในการหุงต้มได้ กากและเปลือกของสบู่ดำนำไปหมักในสภาพไร้อากาศจะได้ก๊าซมีเทนถึง 70% น้ำมันสบู่ดำใช้ได้ดีกับเครื่องยนต์ดีเซลที่ใช้ในการเกษตรที่ติดตั้งบนรถไถเดินตาม และน้ำมันที่เหลือหลังการใช้งานก็ยังคงมีสภาพใสในขณะที่มีอุณหภูมิต่ำ น้ำมันสบู่ดำจะแข็งตัวเมื่อมีอุณหภูมิ -7 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป แสดงให้เห็นว่าน้ำมันสบู่ดำสามารถใช้ได้ดีในสภาพอากาศของประเทศไทย ส่วนการขับเคลื่อนของเครื่องยนต์โดยใช้น้ำมันจากสบู่ดำแทนน้ำมันดีเซลกับเครื่องยนต์การเกษตรอื่น ๆ เช่น ระหัดวิดน้ำ รถอีแต๋นและรถไถนา พบว่าหลังการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ไม่เกิดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfurdioxide) ซึ่งก๊าซชนิดนี้จะเป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจของคนได้ เช่น หลอดลมอักเสบเรื้อรัง และอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพอนามัยมากขึ้นเมื่อมีฝุ่นละอองปะปนอยู่ด้วย และจะเพิ่มความระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อในระบบหัวใจ (สำนักจัดการคุณภาพอากาศและเสียง , 2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ใช้เป็นสารป้องกันกำจัดโรคและแมลง ในแปลงปลูกพืชชนิดอื่นที่ต้องการป้องกันการทำลายของแมลงมักจะปลูกสบู่ดำแทรกลงในแปลง เพราะในต้นสบู่ดำมีสารเคมีที่ปลดปล่อยออกมาขับไล่แมลงศัตรูพืชได้ น้ำสกัดที่ได้จากใบสบู่ดำใช้ฉีดเพื่อควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium* sp. นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารฆ่าเชื้อและยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus, Bacillus* และ *Micrococcus* มีฤทธิ์คงอยู่ได้นาน 6 ชั่วโมง และน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำสามารถนำไปเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา แมลง และหอยที่เป็นพาหะของพยาธิในตับและกระแสโลหิตของคนและสัตว์ ส่วนน้ำยางยับยั้งการเจริญเติบโตของลูกน้ำยุง (ประโยชน์, 2549)

5. ใช้เป็นปุ๋ย กิ่งและก้านใบของสบู่ดำใช้เป็นปุ๋ยพืชสด กากเมล็ดที่เหลือจากการบีบน้ำมันแล้วก็นำไปใช้เป็นปุ๋ยได้ดีเพราะมีสารประกอบของไนโตรเจนสูงเช่นเดียวกับมูลของไก่และกากเมล็ดละหุ่ง จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ จากการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชจากกากเมล็ดสบู่ดำ พบว่ามีอินทรียวัตถุ 80% ไนโตรเจน 4.44% ฟอสฟอรัส 2.09% โพแทสเซี่ยม 1.68% และมีธาตุรองอื่น ๆ เช่น เหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม ทองแดงและกำมะถัน เกษตรกรนิยมนำไปใส่ต้นไม้ผลเพราะไม่มีเมล็ดวัชพืชทำให้ไม่ต้องเสียเวลากำจัดวัชพืชภายหลังการใส่ปุ๋ย และกากเมล็ดสบู่ดำมีธาตุไนโตรเจนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยที่ได้จากมูลกระบือ ไก่ เป็ด ปุ๋ยหมักที่ได้จากฟางข้าว ขยะ และผักตบชวา ยกเว้นธาตุฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมที่ปุ๋ยมูลไก่มีมากกว่า (ระพีพันธุ์และสุขสันต์, 2546)

6. ใช้ทำผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมต่าง ๆ น้ำมันสบู่ดำมีคุณสมบัติแห้งช้าเหมาะสมที่จะทำเป็นหมึกพิมพ์โรเนียว แต่ต้องปรับปรุงสัดส่วนของผงถ่านที่ใช้เป็นสีหมึกพิมพ์ให้พอเหมาะเพื่อให้การไหลเป็นไปอย่างสม่ำเสมอในขณะที่พิมพ์งาน การใช้น้ำมันสบู่ดำร่วมกับสารเคมีบางอย่างจะช่วยทำให้น้ำมันสบู่ดำแห้งเร็วขึ้นเพื่อใช้เป็นสีทาบ้าน การใช้น้ำมันสบู่ดำผสมสารบางชนิดเพื่อทำให้น้ำมันสบู่ดำมีความข้นเหนียวและไม่แห้งเร็วเพื่อใช้ทำกาวของเทปกระดาษ หรือกาวบนแผ่นเซลโลโฟนหรือกาวบนเทปผ้า ส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำสามารถนำไปผลิตเป็นสีธรรมชาติได้ เช่น เปลือกเป็นวัตถุดิบในการผลิตสีน้ำเงินเข้มตามธรรมชาติ ใบใช้เป็นสีย้อมเคลือบเครื่องหนังให้เป็นสีน้ำตาลแทนการฉายด้วยรังสีไวโอเลต รากใช้เป็นวัตถุดิบในการผสมให้เกิดสีเหลือง น้ำยางสบู่ดำมีคุณสมบัติคล้ายชะแลค (shellac) เคลือบเงา ทำสีน้ำมันทาบ้าน และใช้ทำหมึกพิมพ์ (ระพีพันธุ์และสุขสันต์, 2546)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ในสมัยก่อนเด็ก ๆ จะนำน้ำยางใสจากก้านใบของสบู่ดำมาเป่าเล่นเป็นฟองให้ลอยไปในอากาศ ในภาคเหนือของประเทศไทยนิยมนำต้นสบู่ดำไปปลูกเป็นแนวรั้วธรรมชาติ เพื่อป้องกันสัตว์เลี้ยงได้แก่ ม้า โค กระบือ สุกรและลา ที่จะเข้ามาทำลายกัดกินพืชปลูกได้ เพราะว่าน้ำยางจากต้นสบู่ดำมีกลิ่นเหม็นเขียว เนื่องจากมีกรดไฮโดรไซยานิค (hydrocyanic) ซึ่งเหมือนกับต้นและหัวของมันสำปะหลัง แต่เมื่อถูกความร้อนสารดังกล่าวก็จะสลายตัวไป (สุปรียา, 2553) ในประเทศอินเดียใช้ส่วนของใบสบู่ดำไปตำให้ละเอียดแล้วนำไปทาที่ใกล้ตาของม้าเพื่อขับไล่แมลงวัน (Benge, 2006) เมล็ดของสบู่ดำนำไปร้อยเป็นสายด้วยต้นหญ้าแล้วนำไปจุดไฟได้ น้ำมันสบู่ดำนำไปจุดไฟให้แสงสว่าง ทำเทียนไข สบู่ น้ำมันมะกอกและน้ำมันตุรกีแดง ชาวเม็กซิโกปลูกสบู่ดำให้ครั่ง (lac) อาศัยเพื่อที่จะได้ชัน (resin) สำหรับการย้อม (dye) และใช้ทำชะแลค ขี้เถ้าที่ได้จากการเผารากของสบู่ดำมีความเค็มใช้แทนเกลือได้ สบู่ดำมีกลิ่นฉุนใช้ขับไล่หอยทาก และน้ำยางสบู่ดำสามารถยับยั้งโรคด่างของต้นแตงโมได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเคมีในการกำจัดปลาและหนู ประเทศในแถบทวีปแอฟริกานำสบู่ดำไปปลูกเป็นแนวกันลมเพื่อป้องกันการพังทลายของดิน ในประเทศมาดากัสการ์ใช้ต้นสบู่ดำเป็นค้างให้ต้นวนิลาเลื้อยเกาะ เนื้อไม้ของสบู่ดำใช้ผลิตแทนนิน (tannin) น้ำมันสบู่ดำใช้ใส่ผมเพื่อบำรุงรากผมได้ดี ในจังหวัดแพร่มีการนำน้ำมันสบู่ดำมาใช้กับการย้อมเส้นด้ายที่ทำมาจากฝ้ายเพื่อช่วยลดการติดพันกันของเส้นด้าย (สุขสันต์, 2551)

ความหลากหลายทางชีวภาพ

ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) หมายถึง สภาพโดยรวมของสิ่งมีชีวิตและพันธุกรรมทั้งหมดที่ปรากฏในโลกนี้ ไม่ว่าจะเป็นหน่วยของสิ่งมีชีวิต ในระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน หรือระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดที่อยู่ร่วมในประชากรเดียวกันหรือต่างประชากรกัน ตลอดจนสิ่งแวดล้อมที่อยู่โดยรอบทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ในชุมชนของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศที่ต่างกัน ความหลากหลายทางชีวภาพสามารถจำแนกออกได้เป็น 3 ระดับ (วิสุทธิ์, 2538; Swingland, 2001) ดังนี้

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) คือ ความหลากหลายของยีน (gene) ที่มีอยู่ในแต่ละหน่วยของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันเป็นกลุ่ม หน่วยพันธุกรรมหรือยีนรูปแบบต่าง ๆ ที่มีความแตกต่างกัน จะเป็นตัวการสำคัญที่กำหนดรูปร่างและการทำงานของสิ่งมีชีวิตตลอดจนการสืบทอดสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต สารพันธุกรรมทั้งหมดในแต่ละเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเรียกรวมกันว่าจีโนม (genome) และความแปรผันทางพันธุกรรมในหน่วยของสิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วยมีสาเหตุมาจากการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เรียกว่า มิวเทชั่น (mutation) ที่เกิดในระดับยีนหรือโครโมโซม ซึ่งผสมผสานกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศผ่านการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) และเอื้อให้เกิดการแลกเปลี่ยนยีนกันระหว่างโครมาทิด (chromatid) ของโครโมโซมคู่ที่เหมือนกัน (homologous chromosomes) ผ่านกลไกครอสซิง โอเวอร์ (crossing over) ที่เป็นผลให้ยีนสลับที่กันและรวมตัวกันใหม่ (gene recombination) (ประภา, 2550) แล้วถ่ายทอดไปยังลูกหลานในประชากรของสิ่งมีชีวิตที่อยู่กันเป็นหมู่ ส่วนการผสมพันธุ์กันในหมู่ของตนเองทำให้เกิดการถ่ายทอดลักษณะเฉพาะชนิด (species) เดียวหรือชนิดเดียวเรียกว่ายีนพูล (gene pool) ซึ่งการถ่ายทอดของยีนในแต่ละรุ่นต้องผ่านสภาวะกดดันทางวิวัฒนาการ (evolution forces) ต่าง ๆ กัน จะทำให้เกิดการคัดเลือกโดยธรรมชาติ การอพยพ ความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรในแต่ละรุ่นมีการเปลี่ยนแปลงได้

ยีนบางยีนมีรูปแบบคงที่เพราะควบคุมลักษณะสำคัญของการดำรงชีวิต เช่น ยีนที่ควบคุมการสร้างไซโตโครม (cytochome) ที่มีความสำคัญต่อขบวนการหายใจของเซลล์ แต่ก็มียีนจำนวนมากที่มีรูปแบบหลากหลาย และมีส่วนที่ทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรและความหลากหลายของชนิด ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมที่อยู่รอบตัว เพื่อความอยู่รอดของตัวเองและเผ่าพันธุ์ (ประเวศ, 2537; ประไพศรี, 2547)

2. ความหลากหลายในชนิด (species diversity) หมายถึง จำนวนชนิด และจำนวนหน่วยของสิ่งมีชีวิตที่เป็นสมาชิกของแต่ละสปีชีส์ที่มีอยู่ในแหล่งที่อยู่อาศัยของประชากรนั้น ๆ ที่อยู่อาศัยแต่ละชุมชนของสิ่งมีชีวิต (biological community) ในแต่ละพื้นที่มีบทบาทสำคัญต่อความหลากหลายของชนิดและโครงสร้างของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่อาศัยร่วมกัน ซึ่งจะบ่งบอกถึงภาพรวมของความหลากหลายทางชีวภาพได้ เช่น ในบริเวณป่าเขตร้อนชื้น (tropical rain forest) มีชุมชนสิ่งมีชีวิตที่ละเอียดอ่อนซับซ้อนมากมาย และเป็นแหล่งสะสมความหลากหลายทางชีวภาพมหาศาล เช่น ต้นไม้ใหญ่ต้นหนึ่งในป่าเขตร้อนชื้นมีสิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์ เห็ดรา ไลเคนและแมลงจำนวนมากมายหลายร้อยชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับชุมชนสิ่งมีชีวิตในเขตอบอุ่นที่มีป่าสนขึ้นอยู่ต้นสนต้นหนึ่งอาจมีสิ่งมีชีวิตอยู่เพียงไม่กี่ชนิดหรืออาจไม่มีเลย ในความหลากหลายชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในพื้นที่หนึ่งนั้นประกอบด้วย 2 ลักษณะ คือ ความมากชนิด (species richness) กับความสม่ำเสมอของชนิด (species evenness) ความมากชนิด คือ จำนวนชนิดของสิ่งมีชีวิตต่อหน่วยพื้นที่ ส่วนความสม่ำเสมอของชนิด คือ สัดส่วนของจำนวนสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในพื้นที่นั้น (สมศักดิ์, 2537; วิสุทธิ์, 2538)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ความหลากหลายในระบบนิเวศ (ecosystem diversity) หมายถึง นิเวศวิทยาและชุมชนของสิ่งมีชีวิตที่มีความซับซ้อนมาก เนื่องจากเป็นการผสมผสานระหว่างองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตที่มีความเกี่ยวข้องกับสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic component) ซึ่งเข้ามามีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศด้วย เช่น อุณหภูมิ ความชื้น หิน ดิน น้ำ อากาศ แร่ธาตุต่าง ๆ ดังนั้น การศึกษาความหลากหลายของแหล่งที่อยู่อาศัยในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งจะต้องคำนึงถึงจำนวนและความหนาแน่นของประชากรแต่ละชนิดด้วย กลุ่มของสิ่งมีชีวิตกลุ่มใดที่มีจำนวนชนิดอาศัยอยู่มากก็อาจกล่าวได้ว่านิเวศของกลุ่มนั้นมีความหลากหลายในแหล่งที่อยู่อาศัยมากกว่ากลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนชนิดอาศัยอยู่น้อยกว่า ความหลากหลายในระบบนิเวศได้แก่ ป่าดงดิบ ทุ่งหญ้า ป่าชายเลน ทะเลสาบ บึง หนอง ชายหาดและ แนวปะการัง ตลอดจนระบบนิเวศที่มนุษย์สร้างขึ้นเช่น ทุ่งนา อ่างเก็บน้ำ (จรัลธาดา, 2547)

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม

ปัจจุบันการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรทำได้หลายวิธีซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ ได้แก่ การประเมินโดยอาศัยลักษณะภายนอก (phenotype) และการประเมินโดยอาศัยพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การประเมินโดยอาศัยลักษณะภายนอก (phenotype) คือ การเปรียบเทียบลักษณะของพืชที่แสดงออกมาให้เห็น ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological character) ที่สามารถประเมินได้ด้วยสายตา และลักษณะทางเกษตร (agronomic character) ซึ่งเป็นลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของพืช สามารถประเมินได้โดยอาศัยการชั่ง ตวง วัด

1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นลักษณะที่สังเกตเห็นชัดได้ด้วยตาเปล่าได้แก่ รูปร่างใบ ดอก เมล็ด ผล รูปทรงช่อดอก ลักษณะการแตกกิ่ง สีใบ สีดอก สีผล สีเปลือกหุ้มเมล็ด เป็นต้น และสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ตามหลักของเมนเดล ซึ่งจะสะท้อนให้ทราบถึงองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genotype) ที่ควบคุมลักษณะนั้น ๆ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างก็ไม่ได้มีต้นเหตุมาจากการควบคุมของยีนเพียงอย่างเดียว แต่อาจมีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมจึงทำให้การตรวจสอบทำได้ยาก (ไพศาล, 2525) ดังนั้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พืชแสดงออกมานั้นจึงเป็นเพียงหนึ่งลักษณะจากหลายลักษณะที่มีอยู่ในพืชทั้งหมด (genome) โดยมียีนเป็นตัวควบคุมการแสดงออก ซึ่งการแสดงออกนั้นทำให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากร (วิสุทธิ์, 2536) ดังนั้นการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงอาจเกิดความผิดพลาดได้ในกรณีของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน เช่น การเปรียบเทียบลักษณะของใบ สีดอก (สุรินทร์, 2540) ดังนั้นในปัจจุบันนักวิจัยจึงนิยมใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิต

1.2 ลักษณะทางเกษตร เป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative character) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของพืช ประเมินได้โดยอาศัยการชั่ง ตวง วัด เช่น ความสูงของต้น จำนวนกิ่ง อายุวันออกดอก จำนวนผล ขนาดผล น้ำหนักผล จำนวนเมล็ด และน้ำหนักเมล็ด ดังนั้นในการศึกษาต้องคำนึงถึงผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมซึ่งมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและอาจส่งผลให้การแสดงออกของพืชในเชิงปริมาณเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ (Pant *et al*., 2006)

2. การประเมินโดยอาศัยพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) คือการศึกษาองค์ประกอบที่อยู่ภายในพืชที่ประกอบด้วยการเรียงตัวของเบสจนถึงการรวมตัวกันของกรดอะมิโน (amino acid) ชนิดต่าง ๆ ไปเป็นโปรตีน โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งได้แก่ เครื่องหมายโปรตีนและเครื่องหมายดีเอ็นเอ

2.1 การใช้เครื่องหมายโปรตีน (protein marker หรือ isozyme) เป็นการศึกษาหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชด้วยการใช้ความหลากหลายของโมเลกุลโปรตีน (protein polymorphism) เช่น การใช้วิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส (electrophoresis) เพื่อแยกโมเลกุลของโปรตีนและย้อมแถบของโปรตีนจำเพาะด้วยสารที่เหมาะสม (สุรินทร์, 2540) โดยอาศัยหลักการที่ว่า กรดอะมิโน 5 ชนิด ประกอบด้วย 3 ชนิด คือ lysine, arginine และ histidine ซึ่งมีประจุเป็นบวก และอีก 2 ชนิด คือ aspartic acid และ glutamic acid ซึ่งมีประจุเป็นลบ ดังนั้นสายโพลีเปปไทด์แต่ละสายที่ประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนต่าง ๆ จะมีชนิด ปริมาณ ประจุสุทธิ ขนาดและรูปร่างโมเลกุลที่ต่างกัน ซึ่งขนาดของโมเลกุลจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของโปรตีน เทคนิคอิเล็กโทรฟอรีซิสจะทำให้โมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างกันแยกออกจากกันได้ โปรตีนที่เป็นเอนไซม์สามารถตรวจสอบผลได้ง่ายโดยการใช้สารที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัวนั้น ๆ เป็นตัวตรวจสอบ ดังนั้นจึงสามารถจำแนกพืชได้โดยอาศัยรูปแบบของ isozyme (isozyme pattern) หรืออาจกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่า isozyme คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกันแต่มีรูปแบบแตกต่างกันหลายรูป โดยมีคุณสมบัติทางกายภาพและการเร่งปฏิกิริยาต่างกันเล็กน้อย isozyme ที่ต่างกันนี้จะพบในประชากรต่าง ๆ กันของสิ่งมีชีวิตเดียวกัน ความแตกต่างของ isozyme เป็นผลมาจากการมีลำดับกรดอะมิโนในโมเลกุล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่างกัน ทำให้เกิดประจุหรือการแปรสภาพการสังเคราะห์โปรตีนที่ต่างกัน ลักษณะการเร่งปฏิกิริยาของ isozyme มักจะสะท้อนความหลากหลายของชนิดโมเลกุลโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ที่ isozyme ชนิดนั้นมีอยู่ (ดวงพร, 2538; สุรีพร, 2546) ประโยชน์จากการใช้ isozyme มีหลายอย่าง เช่นการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของพืช (Burdon and Robert, 1995) การจัดหมวดหมู่พืช การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์พืช งานปรับปรุงพันธุ์พืช การวินิจฉัยจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และการศึกษาสรีรวิทยาของพืช (เพิ่มพงษ์, 2531) การใช้ isozyme เป็นวิธีการที่ติดตามได้ง่าย รวดเร็วและเสียค่าใช้จ่ายต่ำ แต่มีข้อจำกัดคือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากและต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ การเปรียบเทียบตัวอย่างต้องใช้เนื้อเยื่อชนิดเดียวกันและเจริญอยู่ในระยะเดียวกันเท่านั้น นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมภายนอกบางอย่างอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน เช่น อุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้โปรตีนและเอนไซม์สลายตัวไป คุณสมบัติของเอนไซม์และโปรตีนนั้นจะลดลงทำให้ผลการตรวจสอบไม่ชัดเจน (ชวนพิศ, 2538)

2.2 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับยีนโดยการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ที่มีความแตกต่างกัน วิธีการนี้นิยมใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชและสัตว์อย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีที่มีความแน่นอน แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมแบ่งตามลักษณะการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอได้เป็น 2 กลุ่ม (วิภา, 2549) ดังนี้

2.2.1 Dominant markers เป็นเครื่องหมายที่มีการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอเป็นแบบข่ม (dominance) คือการมีแถบดีเอ็นเอกับไม่มีแถบดีเอ็นเอ และความหลากหลายของแถบที่เกิดจากเครื่องหมายชนิดนี้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0-0.5 ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้คือไม่จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาก่อน และตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่ง dominant markers ยังแบ่งย่อยได้อีกหลายชนิด ได้แก่ RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) และ ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) เป็นต้น

2.2.2 Co-dominant markers เป็นเครื่องหมายที่มีการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอเป็นแบบข่มร่วม (co-dominance) ซึ่งจะปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด แต่แถบดีเอ็นเอมีขนาดแตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และความหลากหลายของแถบที่เกิดจากเครื่องหมายชนิดนี้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0-1.0 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้จำเป็นต้องรู้ข้อมูลของจีโนมก่อน (DNA library) เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาเครื่องหมายขึ้นมาใช้และการตรวจสอบสามารถทำได้ครั้งละหนึ่งตำแหน่ง co-dominant markers ยังแบ่งย่อยได้อีกหลายชนิด เช่น RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), SSRs (Simple Sequence Repeats) หรือ MS (Microsatellites) และ SSCPs (Single Strand Conformational Polymorphisms) เป็นต้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ทั้งในพืชและสัตว์ การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แสดงความจำเพาะกับพันธุ์และช่วยจำแนกพันธุ์พืช งานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืช เช่น ข้าว (Saini *et al*., 2004; Blair *et al*., 1999) ส้ม (Fang and Roose, 1997; Fang *et al*., 1997) ถั่ว (Galvan *et al*., 2003) และมันฝรั่ง (Hale and Miller, 2005) เป็นต้น ในการเปรียบเทียบข้อมูลทางพันธุศาสตร์โมเลกุลกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ข้อมูลทางพันธุศาสตร์โมเลกุลให้รายละเอียดที่มีแบบแผนชัดเจนในด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทั่วไปเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากลักษณะสัณฐานวิทยาและเกษตรซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แสดงออกมาภายนอก ซึ่งเมื่อรวมข้อมูลทั้งสองวิธีการศึกษาเข้าด้วยกันก็จะช่วยทำให้การสรุปผลมีความชัดเจนมากขึ้น (ศิราวุธ, 2544)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือ *In Vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าในระยะเวลาสั้น ๆ โดยอาศัยหลักการของ DNA replication ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในหลอดทดลองแบบซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ รอบซึ่งในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (Caetano-Anolles, 1997) ดังนี้

1. Denaturation เป็นการทำให้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double stranded DNA) คลายเกลียวออกจากกันเป็นสายเดี่ยวอยู่เป็นอิสระ และทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการเกิด DNA replication ซึ่งเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้น ๆ จะเข้าไปจับกับเบสที่เป็นคู่สมแต่ละตัวบนสายดีเอ็นเอที่เป็นแม่พิมพ์ ซึ่งจะเกิดขึ้นในขณะที่อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 40-60 องศาเซลเซียส

3. Extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ต่อเนื่องจากจุดที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบโดยมีเอนไซม์ *Tag* DNA polymerase เป็นตัวทำให้มีการเชื่อมไพรเมอร์ด้วย dNTPs

Tag DNA polymerase เป็นเอนไซม์ได้ถูกค้นพบโดย Saiki *et al*. (1985) จากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus* ที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนและนำมาใช้แทนเอนไซม์ DNA polymerase จากธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิสูง จะทำให้เอนไซม์จะเสียสภาพ (denature) ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปในปฏิกิริยาทุกรอบของการสังเคราะห์ ซึ่ง *Tag* DNA polymerase นี้สามารถทนความร้อนสูงได้ ทำให้การดำเนินปฏิกิริยา PCR สะดวกขึ้น ไม่ต้องมีการเติมเอนไซม์ทุกรอบของปฏิกิริยาและสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องควบคุมปฏิกิริยา PCR อัตโนมัติได้ เทคนิค PCR นี้ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากปริมาณเพียงเล็กน้อยให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่าในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ทันทีโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสและการย้อมแถบดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้นด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ (ethidium bromide) (สุรินทร์, 2545ข.)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorpism) นี้เป็นการรวมเทคนิค RFLP และ PCR เข้าด้วยกัน ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ การตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วเชื่อมต่อด้วย adapter ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ชิ้นเล็ก ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ บริเวณที่เชื่อมต่อเป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ที่ใช้ทำปฏิกริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการ โดยไพรเมอร์จะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับส่วนของ adapter และเป็นคู่สมกับส่วนของเบสตรงตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเพิ่มเบส 2-3 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อให้เกิดการเลือกจับได้เฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วน และสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้จากจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไป เมื่อได้ผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ต้องการแล้วจึงนำมาแยกขนาด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส ซึ่งดีเอ็นเอที่ผ่านการแยกด้วยวิธีนี้จะแสดงความแตกต่างเป็นแถบบนแผ่นวุ้นที่เรียก “polymorphism” ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอนั้น เกิดจากการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและการเลือกจับของไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสที่ปลาย 3' ซึ่งส่งผลให้แถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจลมีขนาดต่างแตกต่างกันไป (สุรินทร์, 2545ก)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ AFLP เป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) การทำค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) สามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่ต่างกันจำนวนมาก รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันในแต่ละตัวอย่างที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงของเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากการมีชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้น คือการมีแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำ AFLP จึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะข่ม โดยปรากฏเป็นการมีแถบหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกันโดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบการแสดงออกของเครื่องหมาย AFLP เป็นแบบข่มมากกว่า (สุรินทร์, 2545ข) แถบของดีเอ็นเอเป็นรูปแบบเฉพาะในแต่ละสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับลายนิ้วมือคน ซึ่งค้นพบโดย Jeffry ปี ค.ศ.1984 แห่งมหาวิทยาลัยเลสเตอร์ ประเทศอังกฤษว่าแถบดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่โดยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้านั้นภาพที่ปรากฏหลังการย้อมดีเอ็นเอจะเป็นขีด ๆ หลายขีดที่มีระยะห่างและขนาดแตกต่างกันคล้ายกับรหัสแท่ง (bar code)

เทคนิค AFLP มีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนน้อย ทำให้เกิด polymorphism ได้จำนวนมากจึงสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี (Mueller and Wolfenbarger, 1999) ใช้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็ได้ แต่เทคนิคนี้มีข้อเสีย เช่น วัสดุที่ใช้มีราคาแพง แถบดีเอ็นเอที่แสดงส่วนใหญ่เป็นการแสดงแบบข่ม การวิเคราะห์ค่อนข้างยากเพราะมีแถบดีเอ็นเอจำนวนมากและมีขนาดใกล้เคียงกัน บางครั้งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันอาจมาจากชิ้นดีเอ็นเอคนละตำแหน่งทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ จึงไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันมาก ๆ เพราะจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวนน้อย ทำให้การวิเคราะห์ผลในแง่การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้ สิ่งที่มีชีวิตใกล้เคียงกันมากก็ไม่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เช่นกัน เพราะจะพบแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันจำนวนน้อย (สุรินทร์, 2545ข) เทคนิค AFLP ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างขวาง เช่น การใช้ศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม การจำแนกพันธุ์พืช การจดทะเบียนลิขสิทธิ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม ฯลฯ มีการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมาย AFLP ในพืชหลายชนิด เช่น rapeseed (*Brassica napus*) (Seyis *et al*., 2003) ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineesis* Jacq.) (Matthes *et al*., 2001) กล้วย (*Musa sp*) (Noyer *et al*., 2005) มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) (ยุคลธร, 2542) ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) (Hongtrakul *et al*., 1997) *Trollius chinensis* L. (Despres *et al*., 2003) และสบู่ดำ (*J. curcas* L.) (Pamidiamarri *et al*., 2010)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค ISSR

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) เป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำและมีความจำเพาะมากโดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวที่ประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำ ๆ ต่อที่ปลาย 3' หรือ 5' ด้วย 2-4 นิวคลีโอไทด์ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กันโดยปฏิกิริยา PCR เพียงครั้งเดียว (Blair *et al*., 1999)และตรวจสอบผลผลิตของปฏิกริยา PCRในวุ้นที่ทำจากอะคริลาไมด์ (denaturing polyacrylamide gel) หรืออะกาโรส (agarose gel) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค ISSR มีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอสูง และแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีการแสดงออกแบบข่ม เทคนิค ISSR สามารถทำได้โดยไม่ต้องศึกษายีโนมก่อน ทำให้เสียค่าใช้จ่ายน้อย จึงสะดวกและรวดเร็ว ใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดกันมาก ๆ ได้ดี (Zietkiewicz *et al*., 1994) เนื่องจากเทคนิคนี้ให้ความหลากหลายในรูปแบบดีเอ็นเอสูง เมื่อทำซ้ำจะให้ผลคงเดิม (Fang and Roose, 1997) เครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องหมายที่มีผู้นิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะพืชที่มีฐานพันธุกรรมแคบ ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค ISSR พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี ถึงแม้เครื่องหมาย ISSR จะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ข้อมูลทางพันธุกรรมได้มากมาย แต่ก็พบว่ามีข้อจำกัดที่สำคัญคือ การพัฒนาหรือสร้าง ISSR primer มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงมาก และปัญหาด้านเทคนิค คือ การวิเคราะห์ผลค่อนข้างยาก โดยเฉพาะกรณีที่ต้องการรู้ขนาดอัลลีล (allele) ที่แน่นอน ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเกิด “shutter band” ทำให้การอ่านแถบดีเอ็นเอผิดพลาดได้ (Morgante and Olivieri, 1993; Brown *et al*., 1996; Paterson, 1996; Powell *et al*., 1996) เครื่องหมาย ISSR ใช้ศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต การจดทะเบียนลิขสิทธิ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม ซึ่งใช้ตรวจสอบกับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้ พืชที่มีการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมาย ISSR เช่น มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (Mc Gregor *et al*., 2000) สับปะรดสี (*Ananas bracteatus*) (Carlier *et al*., 2003) ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus*) (Vander Nest *et al*., 2000) กะหล่ำดอก (*Brassica oleracea* var.botrytis) (Bornet *et al*., 2002)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ

สบู่ดำมีการกระจายพันธุ์ไปทั่วโลก และสามารถขึ้นได้ในพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมต่าง ๆ กัน เช่น พื้นที่ที่มีอุณหภูมิสูง แห้งแล้ง ลาดเอียง และมีระดับ pH ต่าง ๆ หรือแม้กระทั่งดินที่ใช้การปลูกสับปะรดมาก่อนแล้วซึ่งมีสภาพเป็นกรดก็ตาม (Gübitz *et al*., 1999) นอกจากนี้สบู่ดำยังเป็นพืชเอนกประสงค์ (multipurpose plant) ทุกส่วนของต้นสบู่ดำสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงจากฟอสซิล (fossil)จากวิกฤตด้านพลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิงที่เกิดขึ้นทั่วโลกตั้งแต่ปี 2549 เป็นต้นมา ทำให้สบู่ดำได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก และมีการส่งเสริมให้ปลูกในประเทศต่าง ๆ ของทวีปแอฟริกา เอเชีย และลาตินอเมริกา (Basha and Sujatha, 2007) สบู่ดำจึงเป็นพืชที่น่าจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ในระยะประมาณ 10 ปีที่ผ่านมานี้มีผู้สนใจจำนวนไม่น้อยได้รวบรวมพันธุ์สบู่ดำจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังรายงานต่อไปนี้

Becker (1999) พบว่าสบู่ดำในประเทศนิคารากัวมีจำนวนพันธุ์น้อย แต่ผลและเมล็ดมีขนาดใหญ่ ให้ผลผลิตสูง ส่วนในประเทศเม็กซิโกมีพันธุ์สบู่ดำที่ไม่มีสารพิษพวก phorbol ester อยู่ในเมล็ด สามารถนำไปรับประทานได้ด้วยการย่างหรืออบก่อน ส่วนน้ำมันสบู่ดำที่สกัดจากเมล็ดที่ไม่มีสารพิษนี้สามารถใช้บริโภคได้

Prabakaran and Sujatha (1999) พบว่า *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja ที่ขึ้นอยู่แถบพรมแดนในเขต Tanjore, Pudokottai, Trichirapalli และ Ramnad ของรัฐ Tamil Nadu ประเทศอินเดีย มีลักษณะอยู่ระหว่าง *Jatropha curcas* และ *Jatropha gossypifolia* เมื่อนำมาศึกษาด้วยวิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) และไอโซไซม์ (isozyme) พบว่า *Jatropha tanjorensis* เป็นลูกผสมระหว่างพืชทั้ง 2 ชนิด (interspecific hybrid) ดังกล่าวข้างต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sujatha and Prabakaran (2003) ได้ศึกษาลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *J. curcas* และ *J. integerrina* พบว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกหลายแบบ เช่น มีสีใหม่ 3 สี แต่เมื่อนำมาทำการผสมกลับ ลูกผสมกลับที่ได้ให้สีดอกที่แตกต่างออกไป คือ มีสีชมพูเข้มแกมเขียวไปจนถึงสีขาวทั้งดอก และจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ พบว่าลูกผสมใหม่ทั้งหมดมีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความเกี่ยวข้องกับพ่อและแม่

Ginwal *et al*. (2005) ได้ตรวจสอบความผันแปรของลักษณะเมล็ดสบู่ดำที่รวบรวมจากพื้นที่ต่าง ๆ 10 แห่งในตอนกลางของประเทศอินเดีย พบว่าสบู่ดำมีความผันแปรอย่างมีนัยสำคัญในลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ด (สี ขนาด และน้ำหนักเมล็ด) การงอกของเมล็ด (ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความงอก) และการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่งอกจากเมล็ด (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ความสูงและเส้นผ่าศูนย์กลางของต้นกล้า) และชีวมวล (biomass) ของต้นกล้า เมล็ดสบู่ดำจากพื้นที่ Chhindwara เป็นแหล่งที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบกับเมล็ดจากแหล่งอื่น ๆ ค่าความผันแปรของลักษณะที่แสดงออกมา (phenotypic variance) ค่าความผันแปรทางพันธุกรรม (genotypic variance) ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (coefficient of variability) ของลักษณะที่แสดงออกมา และค่าอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมอย่างกว้าง (broad sense heritability) ของลักษณะต่าง ๆ ของเมล็ดมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่านักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกสบู่ดำตามลักษณะที่ต้องการได้จากเมล็ดที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ

Basha and Sujatha (2007) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจำนวน 42 accession จากพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ในประเทศอินเดียร่วมกับพันธุ์สบู่ดำที่ไม่มีพิษ (non-toxic genotype) จากประเทศเม็กซิโกเพื่อนำเชื้อพันธุกรรมที่ดีเด่นและแตกต่างกันไปใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ ผลการประเมินพบว่า สบู่ดำทั้ง 42 accession มีความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับต่ำ โดยมีค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) เท่ากับ 42 % เมื่อตรวจสอบโดยใช้ RAPD primer 400 ไพรเมอร์ และเท่ากับ 33.5% เมื่อตรวจสอบโดยใช้ ISSR primer 100 ไพรเมอร์ ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเมื่อตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมาย ISSR สามารถแยกสบู่ดำของอินเดียออกจากสบู่ดำจากประเทศเม็กซิโก จากการจัดทำ dendrogram โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (genetic similarity coefficient) สามารถจัดแบ่งสบู่ดำทั้ง 43 accession ออกเป็น 2 กลุ่ม (cluster) ใหญ่ ค่า principal component analysis (PCA) ที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องเป็นอย่างดีกับการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยวิธี cluster analysis ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า มีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จะต้องเพิ่มฐานทางพันธุกรรม (genetic base) ของสบู่ดำให้กว้างขึ้นโดยการนำเข้าสบู่ดำจากแหล่งอื่น ๆ ที่มีความแตกต่างกันทางภูมิประเทศ

Kaushik *et al*. (2007) ได้ประเมินความผันแปรและความแตกต่างทางพันธุกรรมของลักษณะเมล็ดและปริมาณน้ำมันในเมล็ดของสบู่ดำจำนวน 24 accession ที่รวบรวมจากเขตที่มีความแตกต่างของสภาพภูมิอากาศทางการเกษตร (agroclimatic zone) ในรัฐ Haryana ประเทศอินเดีย ผลการประเมินแสดงให้เห็นว่าขนาดเมล็ด น้ำหนัก 100 เมล็ด และปริมาณน้ำมันในเมล็ดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในระหว่าง accession ของสบู่ดำ โดยปริมาณน้ำมันในเมล็ดผันแปรตั้งแต่ 28.0% ใน accession IC -520589 ถึง 38.8% ใน IC 520601 จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี Euclidian ทำให้สามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกได้เป็น 6 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 3 มีจำนวน accession ของสบู่ดำมากที่สุดในระหว่างสบู่ดำทั้ง 6 กลุ่มนั้น กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ที่สุด ในขณะที่กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มที่มีน้ำหนักเมล็ดและปริมาณน้ำมันสูงที่สุด ผลการศึกษานี้ได้ให้ข้อเสนอแนะว่า การผสมข้ามระหว่าง accession ของสบู่ดำในกลุ่มที่ 4 และ 6 จะมีผลทำให้ความผันแปรในลักษณะเมล็ดของลูกในชั่วต่อ ๆ มากว้างมากขึ้น

Sun *et al*. (2008) ได้รวบรวมสบู่ดำจำนวน 58 accession ในประเทศจีนไว้ที่ South China Botanical Garden ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์สบู่ดำโดยจำแนกตามสภาพภูมิประเทศ และศึกษาความสัมพันธ์ของสบู่ดำด้วยเทคนิค SSR และ AFLP และได้พัฒนาเครื่องหมาย SSR จากลำดับเบสที่ปรากฏในเทคนิค AFLP ด้วยวิธีการ FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats) จำนวน 17 ไพรเมอร์ และมีเครื่องหมาย SSR จำนวน 1 ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างถึง 2 อัลลีล และพบว่าการจับคู่และการสลับคู่กันของ AFLP primer จำนวน 7 ไพรเมอร์ สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) จำนวน 70 แถบหรือคิดเป็น 14.3% ซึ่งนับว่ามีความแตกต่างน้อยมาก และการจัดกลุ่มโดยอาศัยแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมาย AFLP พบว่าสบู่ดำที่รวบรวมจากเมือง Guizhou มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากตัวอย่างที่มาจากแหล่งอื่น

Ganesh Ram *et al*. (2008) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Jatropha* จำนวน 7 ชนิด (species) และสบู่ดำ 5 accession โดยใช้เครื่องหมาย RAPD จากการประเมินโดยใช้ RAPD primer ทั้งหมด 26 ไพรเมอร์ พบว่า RAPD primer จำนวน 18 ไพรเมอร์สามารถให้ banding pattern ที่มีแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจำนวน 112 แถบจากจำนวนแถบทั้งหมด 134 แถบ ซึ่งคิดเป็นค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพืชทั้งหมดที่ศึกษานี้เท่ากับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

80.2% ค่า polymorphic information content (PICs) เฉลี่ยซึ่งคำนวณจากค่าความถี่ของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันของพืชทั้งหมดมีค่าสูง (0.44) ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันแบบ Jaccard (Jaccard's coefficient of similarity) ผันแปรอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง 0.85 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชทั้งหมดนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี UPGMA ทำให้สามารถแบ่งพืชทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำทั้ง 5 accession กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยพืช 6 ชนิด และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยพืชเพียงชนิดเดียวที่มีความแตกต่างทางพันธุ-กรรมสูงกว่าชนิดอื่น ๆ และรูปแบบของการจัดกลุ่มทั้งหมดสอดคล้องกับค่า principal component analysis (PCA) ซึ่งเป็นการยืนยันถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชทั้งหมดที่ศึกษา

Rao *et al*. (2008) ได้ประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะเมล็ด (seed character) และลักษณะการเจริญเติบโต (growth character) ของสบู่ดำจำนวน 32 accession ที่รวบรวมจากพื้นที่ต่าง ๆ 11 แห่งในอินเดีย ผลการประเมินได้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะเมล็ด เช่น ขนาด น้ำหนักและปริมาณน้ำมันในเมล็ด และลักษณะการเจริญเติบโต เช่น ความสูงต้น อัตราส่วนของดอกตัวเมียต่อดอกตัวผู้ และผลผลิตเมล็ด จากการวิเคราะห์โดยวิธี path analysis พบว่าอัตราส่วนของดอกตัวเมียต่อดอกตัวผู้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับผลผลิตเมล็ดสูงที่สุด (0.789) รองลงมาคือจำนวนกิ่งแขนง (0.612) และจำนวนวันนับจากติดผล (fruiting) ถึงสุกแก่ (maturing) (0.431) ตามลำดับ และจากการจัดกลุ่มโดยวิธี K-mean พบว่าสามารถจัดแบ่งสบู่ดำทั้ง 32 accession ออกเป็น 4 กลุ่มโดยอาศัยลักษณะเมล็ด และอีก 5 กลุ่มโดยอาศัยลักษณะการเจริญเติบโตและผลผลิต

Cai *et al*. (2010)ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศจีนโดยใช้เครื่องหมาย ISSR กับสบู่ดำ 224 accession ซึ่งประกอบด้วยสบู่ดำจากประเทศจีน 219 accession และ 5 accession จากประเทศพม่า โดยใช้ ISSR primer จำนวน 15 ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 169 แถบ โดยแยกเป็นแถบที่มีความแตกต่าง 127 แถบ คิดเป็น 75.15% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสบู่ดำจากประเทศจีน แสดงให้เห็นว่าสบู่ดำของจีนมีความหลากหลายสูง จากการวิเคราะห์โดย dendrogram พบว่า สบู่ดำส่วนใหญ่ของจีนอยู่ในกลุ่มย่อย La และสบู่ดำจากเกาะ Hainan ส่วนบริเวณพื้นที่ที่อยู่ข้างเคียงจังหวัด Guangdong จัดอยู่ในกลุ่มย่อย Lb แล้วได้คัดเลือกสบู่ดำไว้ 46 accession คิดเป็น 20.54% ของสบู่ดำที่นำมาศึกษาซึ่งครอบคลุมลักษณะที่สำคัญมากกว่า 90 % ลักษณะที่สำคัญดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำมันและความหลากหลายทางพันธุกรรม และมีข้อสังเกตว่า ประชากรสบู่ดำในเขตร้อนน่าจะเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีความสำคัญ และควรผสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้ามระหว่างสบู่ดำในเขตร้อนกับสบู่ดำที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำในประเทศจีน

Mastan *et al*. (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ โดยใช้เครื่องหมาย RAPD, AFLP และ SSR ต้นสบู่ดำที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ได้มีการบันทึกลักษณะเบื้องต้นไว้ เช่น ความสูงต้น ขนาดทรงพุ่ม จำนวนเมล็ดต่อผล น้ำหนัก 100 เมล็ด ผลผลิตเมล็ด และปริมาณน้ำมัน จากการศึกษาพบว่า การใช้เครื่องหมาย RAPD จำนวน 15 ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 250 แถบ การใช้เครื่องหมาย AFLP จำนวน 17 ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 822 แถบ และการใช้เครื่องหมาย SSR ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 19 แถบ ซึ่งสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างเรียงตามชนิดของเครื่องหมายซึ่งมีจำนวนแถบตามลำดับ คือ 141, 346 และ 7 แถบ และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของแถบที่มีความแตกต่างตามชนิดของเครื่องหมาย RAPD AFLP และ SSR ดังนี้ 56.43, 57.9 และ 36.84 % ตามลำดับ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Jaccard พบว่า มีความคล้ายคลึง 0.91, 0.90 และ 0.91% และการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (PCA) พบว่าสบู่ดำ JCC-11, 12, 13, 14 และ 15 เป็นกลุ่มที่ให้ผลผลิตสูง และสบู่ดำ JCC11 เป็นต้นเดียวที่มีการปรับตัวในสภาพภูมิประเทศได้ดีกว่าต้นอื่น

จากการวิเคราะห์สบู่ดำทั้งหมดพบว่าสบู่ดำ JCC6 (ใน RAPD), JCC8 (ใน AFLP), JCC 6 และ JCC10 (ใน SSR) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน และให้คำแนะนำในการวิจัยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปว่าควรศึกษาเกี่ยวกับการทำแผนที่ยีน (QTL mapping) และควรใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection หรือ MAS)

Shena *et al*. (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ 63 กลุ่มจาก 10 ประเทศในทวีปเอเชีย แอฟริกา และเม็กซิโก ซึ่งปลูกอยู่ใน ประเทศจีนและเวียดนาม โดยใช้เครื่องหมาย AFLP จำนวน 4 ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 89 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอจำนวน 87 แถบเป็นแถบที่ไม่ให้ความแตกต่าง แสดงให้เห็นว่าสบู่ดำที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ (0.15) โดยค่า AMOVA มีความแปรปรวนระหว่างกลุ่มสบู่ดำ 31% และความแปรปรวนในกลุ่มสบู่ดำ 69% แสดงให้เห็นว่าการถ่ายทอดยีน (Nm) ในกลุ่มสบู่ดำมีค่าต่ำ ค่าการเปลี่ยนแปลงของยีนระหว่างกลุ่มสบู่ดำอยู่ที่ 0.44 ค่าของตำแหน่งยีนที่แตกต่าง (Np) อยู่ที่ 16 และเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของตำแหน่งยีน (Pp) อยู่ที่ 18% ค่าดัชนีความหลากหลายโดยใช้ Nei (H) อยู่ที่ 0.07 และค่า Shannon (I) อยู่ที่ 0.10 ข้อมูลทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และพบว่าสบู่ดำจากเม็กซิโกมีความหลากหลายสูงมากเมื่อวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ด้วยวิธี UPGMA และเมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA พบว่าสามารถแบ่งสบู่ดำได้ 4 กลุ่มคือ กลุ่มย่อยจากพื้นที่ที่มีสภาพภูมิประเทศที่มีความแตกต่างกันในอินเดีย ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มย่อยในจีน กลุ่มสบู่ดำจากประเทศในเอเชียใต้ แอฟริกา และเม็กซิโก ซึ่งมีคุณสมบัติไม่แตกต่างกับสบู่ดำจากเม็กซิโก ถึงแม้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่ปลูกในเอเชียจะต่ำ แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสบู่ดำในเอเชียจำนวน 6 กลุ่ม มีความหลากหลายสูงกว่าประชากรกลุ่มอื่นๆที่นำมาศึกษา

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศไทย

ในปลายสมัยกรุงศรีอยุธยาพ่อค้าชาวโปรตุเกสได้นำเมล็ดและท่อนพันธ์สบู่ดำจากทวีปอเมริกากลางมาปลูกในประเทศไทย เพื่อนำเมล็ดมาบีบน้ำมันสำหรับทำสบู่และจุดไฟให้แสงสว่างเวลากลางคืน และใช้ส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำเป็นสมุนไพรรักษาโรคได้หลายโรค (ระพีพันธ์ และสุขสันต์, 2546) ปัจจุบันสบู่ดำมีปลูกอยู่ทุกภาคของประเทศไทย (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาอาชีพเกษตรชัยนาท, 2553) แต่การศึกษาถึงความหลากหลายหรือความผันแปรทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศไทยยังมีน้อย ดังนี้

แอนนา และคณะ (2549) ได้รวบรวมท่อนพันธุ์สบู่ดำจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย จำนวนทั้งหมด 52 accession นำมาปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา เพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตร พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำที่รวบรวมมาได้ไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากมีอิทธิพลจากปัจจัยภายนอกมาเกี่ยวข้องอย่างมาก นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอย่างสบู่ดำเบอร์ 16 ที่รวบรวมมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จ.กาฬสินธุ์) ให้ผลผลิตเมล็ดรวม 2 ปีสูงสุดคือ 1,326 กิโลกรัม/ไร่ รองลงมาคือ ตัวอย่างสบู่ดำเบอร์ 74 จากภาคใต้ (จ.ชุมพร) ให้ผลผลิตรวม 2 ปีเท่ากับ 618 กิโลกรัม/ไร่

แอนนา และคณะ (2550ก) ได้รวบรวมท่อนพันธุ์สบู่ดำจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย จำนวน 162 accession นำมาปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา เพื่อประเมินผลผลิตและลักษณะทางเกษตร โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ปลูกเมื่อวันที่ 21 เมษายน 2549 พบว่า สบู่ดำ KUBP222 และ KUBP217 ที่รวบรวมจาก จ.สระแก้ว ให้ผลผลิตเมล็ดสูงสุดในปีแรก และการทดลองที่ 2 ปลูกเมื่อวันที่ 14 มิถุนายน 2549 พบว่าสบู่ดำ KUBP260 ที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รวบรวมจาก จ.แม่ฮ่องสอน ให้ผลผลิตเมล็ดสูงสุดในปีแรก อย่างไรก็ตามจะประเมินผลผลิต และลักษณะทางเกษตรในปีที่ 2 และ 3 อีกเพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำต่อไป

แอนนา และคณะ (2550ข) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลผลิตเบื้องต้นของสายพันธุ์สบู่ดำที่คัดเลือกจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา จำนวน 31 accession วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design จำนวน 3 ซ้ำ ระยะปลูกระหว่างแถว 2.25 เมตร ระยะระหว่างต้น 3 เมตร ผลการทดลองพบว่าสบู่ดำที่ให้ผลผลิตสูงสุด 6 อันดับแรกจากทั้งหมด 31 accession เป็นสบู่ดำที่รวบรวมมาจากจังหวัดต่าง ๆ ได้แก่ พัทลุง นครศรีธรรมราช มุกดาหาร อำนาจเจริญ สุรินทร์ และอุบลราชธานี โดยให้ผลผลิตเมล็ดที่ความชื้น 15% หลังจากปลูกได้ 349 วัน ดังนี้ 334, 289, 273, 253, 248, และ 246 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ

ศิริศักดิ์และคณะ (2550) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่รวบรวมในประเทศไทยและต่างประเทศจำนวน 138 accession และพืชที่ใช้เป็น outgroup 4 ชนิด (species) โดยใช้เครื่องหมาย AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ ผลการศึกษาพบว่าได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 680 แถบ และค่า Polymorphic Information Contents (PICs) อยู่ระหว่าง 0.000-0.1092 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0208 และสบู่ดำทั้งหมดที่นำมาศึกษามีความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) สูง โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่คำนวณตามวิธีของ Sneath and Sokal (1973) อยู่ระหว่าง 0.51-1.00 และจากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และนำมาสร้างเป็น phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม NTSYS 2.1 สามารถจำแนกตัวอย่างสบู่ดำออกเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA) โดยพบว่าค่า PCA 1, PCA2 และ PCA 3 คลอบคลุมตัวอย่างสบู่ดำประมาณ 84.43 % ของความแปรปรวนทั้งหมด และสามารถแบ่งกลุ่มของพืชตัวอย่างได้เป็น 6 กลุ่ม ประกอบด้วยพืชที่เป็น outgroup 4 กลุ่มซึ่งเป็นพืชที่ต่างชนิดกันและสบู่ดำ 2 กลุ่ม

พัชรินทร์ และคณะ (2551) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจำนวน 34 accession จากประเทศจีน อินเดีย เวียดนาม และไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD พบว่า RAPD primer 8 คู่ จากทั้งหมด 37 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 1-4 แถบ/ไพรเมอร์ หรือเฉลี่ย 1.75 แถบ/ไพรเมอร์ ค่า PICs ผันแปรอยู่ระหว่าง 0.168-0.999 หรือเฉลี่ย 0.802 ซึ่งจัดว่าเป็นค่าที่สูง แสดงว่าสบู่ดำทั้ง 34 accession มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง เมื่อจัดสบู่ดำออกเป็นกลุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient ที่ 0.45 สามารถแบ่งสบู่ดำได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไทยกับอินเดีย และกลุ่มจีนกับเวียดนาม ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการวางแผนคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำในอนาคต

ศิริศักดิ์และคณะ (2555) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจำนวน 128 accession ที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ทั่วประเทศไทยและนำเข้าจากประเทศอื่น ๆ อีก 6 ประเทศ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรรวม 23 ลักษณะ โดยปลูกสบู่ดำที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา วางแผนการทดลอง randomized complete block design ทำ 3 ซ้ำ จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายต่ำมากในลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสามารถจำแนกสบู่ดำทั้งหมดได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยสบู่ดำส่วนใหญ่จำนวน 127 accession ในขณะที่กลุ่มสองประกอบด้วยสบู่ดำเพียง 1 accession คือ J23 (สบู่ดำใบด่าง) จากการตรวจสอบลักษณะทางเกษตรจำนวน 23 ลักษณะ พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายสูงในลักษณะทางเกษตร จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะทางเกษตร พบว่าลักษณะจำนวนเมล็ดต่อต้นและน้ำหนักเมล็ดต่อต้นมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับทุกลักษณะ ยกเว้นลักษณะอายุวันออกดอกและจำนวนกิ่งแรก เมื่อนำข้อมูลลักษณะทางเกษตรไปวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) พบว่าองค์ประกอบหลักสององค์ประกอบแรกครอบคลุม 61.73% และ 10.13% (71.86%) ของความแปรปรวนทั้งหมด และจากกราฟ PCA 2 มิติแสดงให้เห็นว่า accession ต่าง ๆ ของสบู่ดำมีการกระจายตัว แต่ไม่สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามสบู่ดำบาง accession มีลักษณะเฉพาะบางอย่างที่สามารถแยกออกมาได้อย่างชัดเจนโดยเฉพาะ J117 (สบู่ดำ KUBP 74-1 จาก อ.หลังสวน จ.ชุมพร) มีลักษณะทางเกษตรที่ดีหลายอย่างและได้รับการพิจารณาว่าเป็นเชื้อพันธุกรรมที่ดีเด่น

การใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมนับเป็นสิ่งสำคัญมากต่อระดับความมั่นคงของความหลากหลายทางชีวภาพ ที่ทำให้ระบบในธรรมชาติสามารถดำรงอยู่ได้ภายใต้สภาพการณ์ของสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ดังนั้นความหลากหลายทางชีวภาพจึงมีความสำคัญยิ่งต่อสิ่งแวดล้อม เศรษฐกิจและวัฒนธรรม แต่ในปัจจุบันมนุษย์เป็นผู้ที่พยายามทำลายความหลากหลายดังกล่าวให้ลดลงและได้พยายามสร้างสิ่งที่ทดแทนด้วยความหลากหลายที่อยู่ในระดับต่ำกว่า เช่น การตัดถางป่าเต็งรังแล้วปลูกสวนป่าทดแทนโดยมีความคิดว่าป่าเต็งรังมีประโยชน์เชิงเศรษฐกิจต่ำ จึงปลูกสัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หรือปลูกยูคาลิปตัสแทนที่ สวนป่าลักษณะดังกล่าวเป็นระบบนิเวศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพต่ำเนื่องจากมีสิ่งมีชีวิตน้อยชนิด จึงทำให้ระบบนิเวศใหม่ไม่ทนทานต่อการผันแปรของสิ่งแวดล้อม เช่น การเกิดการระบาดของเชื้อรา เป็นต้น และสุดท้ายมนุษย์จะต้องเป็นผู้ที่เข้าไปดูแลรักษา (treatment) เพื่อให้ระบบอยู่ได้ เช่น การกำจัดแมลงและเชื้อรา อันเป็นสาเหตุของปัญหาการนำสารเคมีเข้าสู่ระบบนิเวศ ทำให้เกิดการทำลายความหลากหลายทางชีวภาพของโลกอย่างรุนแรงในวงกว้างมากขึ้น (ชนวน, 2537) นอกจากนี้ความหลากหลายทางชีวภาพยังถูกคุกคามจากการเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติที่รวดเร็ว เช่น แผ่นดินไหว ภูเขาไฟระเบิด น้ำท่วม ไฟป่า ฯลฯ ซึ่งมีผลทำให้สิ่งมีชีวิตตามพื้นที่ของระบบนิเวศธรรมชาติเปลี่ยนแปลงไปด้วย สิ่งมีชีวิตใดไม่สามารถปรับตัวได้ทันท่วงทีก็อาจสูญพันธุ์ ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์มีประโยชน์ต่อมวลมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะมนุษย์ได้ใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพที่เป็นทรัพยากรทางธรรมชาติเพื่อเป็นปัจจัยในการดำรงชีวิตเช่น อาหาร เครื่องนุ่งห่ม ที่อยู่อาศัย ยารักษาโรค ซึ่งสามารถแยกเป็นด้านต่าง ๆ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. ด้านการเกษตรและอาหาร

ทรัพยากรพันธุกรรมพืช (plant genetic resources) ถือได้ว่าเป็นสมบัติที่มีค่ายิ่งของมวลมนุษย์ เป็นมรดกทางธรรมชาติที่สำคัญสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายเช่น พันธุ์พืชเพื่ออาหารและการเกษตร ซึ่งได้รับการถ่ายทอดพันธุกรรมที่มีอยู่ในพันธุ์พืชพื้นเมือง พืชป่า วัชพืช และพันธุ์พืชปรับปรุง (บริบูรณ์, 2547) ซึ่งเป็นพันธุ์พืชชั้นสูง (higher plants) ราว 30,000 ชนิดที่นำมาบริโภคได้ และ 7,000 ชนิดที่ได้รับการรวบรวมและปลูกเพื่อใช้เป็นอาหารและการเกษตร มีเพียง 30 ชนิดที่จัดเป็นพืชอาหารหลักของประชากรโลก คือ พืชพวกที่ให้แป้ง ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง พืชเหล่านี้เป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงานและโปรตีนถึง 90 % (FAO, 1998) ได้มีการนำความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์พืชที่มีผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี เช่น ข้าว (rice) ซึ่งเป็นอาหารหลักของคนเอเชีย มีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโดยสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute, IRRI) ในประเทศฟิลิปปินส์ โดยพัฒนามาจากข้าวสายพันธุ์ดั้งเดิมทุกสายพันธุ์ในเอเชีย เพื่อให้ได้ข้าวสายพันธุ์ใหม่ อันนำมาซึ่งผลผลิตที่สูงขึ้นกว่าเดิม เช่น พันธุ์ IR - 8 นอกจากนี้ยังมีการค้นพบยีนที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจากจังหวัดสุโขทัย และข้าวโพด (maize) ก็มีการค้นพบข้าวโพดที่ต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสจากป่าในประเทศเม็กซิโก และพบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากพืชในสกุลกะหล่ำ (*Brassica oleracea*) ที่ให้กำเนิดพันธุ์พืชผักอย่างน้อย 7 พันธุ์ นอกจากนี้ยังพบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สายพันธุ์พืชที่ให้โปรตีนและพลังงานสูงจากพืชป่าด้วยกันเช่น (บริบูรณ์, 2547) ดังนั้นการพัฒนาพันธุกรรมพันธุ์พืชเพื่อการผลิตอาหารนั้นจำเป็นต้องมีการพึ่งพาอาศัยการสนับสนุนทรัพยากรพันธุ์พืชจากต่าง ประเทศในภูมิภาคอื่น ๆ ของโลก ซึ่งแหล่งพันธุกรรมของบางลักษณะอาจมีในภูมิภาคหนึ่ง แต่ไม่มีในอีกภูมิภาคหนึ่ง หรือในบางภูมิภาคอาจจะต้องอาศัยทรัพยากรพันธุกรรมพืชจากแหล่งอื่น ๆ ทั้งหมด เช่น ประเทศในอเมริกาเหนือ เป็นต้น (สมศักดิ์, 2537)

2. ด้านการแพทย์

การพัฒนาทางการแพทย์และสาธารณสุขสมัยใหม่ของประเทศได้ละทิ้ง “ภูมิปัญญา” ความรู้ทางด้านการแพทย์และเภสัชวิทยาดั้งเดิมที่เรียกว่า “แผนโบราณ” ที่ใช้พืชและสัตว์เป็นอาหารและยาในการรักษาคนไข้ แต่เดิมใช้วิธีการบริโภคยาโดยการใช้ส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ไม้ เปลือกไม้ ที่เรียกว่า “สมุนไพร” มาต้มแล้วดื่มเป็นยาน้ำ ซึ่งแตกต่างกับการใช้ยาสมัยใหม่คือบริโภคยาเป็นเม็ดหรือยาฉีดเข้าร่างกาย ซึ่งวิธีการบริโภคยาในสมัยก่อนค่อนข้างไม่สะดวกจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คนส่วนมากหันไปบริโภคยาสมัยใหม่ โดยตัวยาที่ฉีดหรือกินนั้นก็สกัดมาจากพืชอย่างเดียวกัน ดังนั้น เมื่อกล่าวถึงชนิดพืชที่ใช้เป็นยา โดยทั่วไปจึงนึกถึงการนำพืชมาต้มเป็นยาหม้อ ทำให้ความสำคัญของต้นพืชที่ใช้เป็นยาไม่เชื่อมโยงกับตัวยาที่ฉีดเข้าร่างกาย จึงทำให้ความสำคัญของต้นพืชที่ใช้สกัดยาไม่ได้รับความสนใจ ตัวยาหรือสารเคมีบริสุทธิ์ที่สกัดจากพืชนั้นมาจากพืชชั้นสูงประมาณ 119 ชนิด การค้นพบตัวยาส่วนใหญ่ได้ความรู้มาจากการรักษาโรคต่าง ๆ ของคนท้องถิ่น ซึ่งความรู้ในการใช้ตัวยาจากพืชเพื่อรักษาคนไข้ดังกล่าวก็ถูกนำไปพัฒนาการผลิตยาออกจำหน่ายในเชิงอุตสาหกรรม ซึ่งยาที่ผลิตจะต้องใช้พืชสมุนไพรเป็นสำคัญ องค์การอนามัยโลก (world organization) ประมาณไว้ว่า 80 % ของประชากรในประเทศกำลังพัฒนาพึ่งพาอาศัยยาพื้นบ้านเพื่อตอบสนองความจำเป็นในการดูแลรักษาสุขภาพมูลฐาน และประมาณ 85 % ของยาพื้นบ้านเป็นสารที่ได้มาจากพืช (อ้อมบุญ, 2547) ปัจจุบันนี้หลายประเทศมีความสนใจและสนับสนุนให้มีการค้นคว้าทดลองเพื่อหาตัวยาใหม่ ๆ จากพืชอย่างกว้างขวาง เช่น สาธารณรัฐประชาชนจีน ญี่ปุ่น อินเดีย และเยอรมัน เป็นต้น ส่วนประเทศสหรัฐอเมริกาได้ให้ความสนใจโดยมีบริษัทผู้ผลิตยาแห่งหนึ่งของสหรัฐอเมริกาชื่อ ABC pharmaceutical corporation สนใจการค้นคว้าทดลองเพื่อหาตัวยาใหม่จากพืชโดยศึกษาตำรายาพื้นบ้านต่าง ๆ ที่มีการเขียนไว้ และได้นำตัวอย่างพืชที่ใช้รักษาคนไข้มายังห้องทดลองของบริษัทเพื่อการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ต่อไป ในประเทศไทยมีกรณีศึกษาเกี่ยวกับการผลิตยาจากพืชสมุนไพรคือ บริษัทผลิตยาของต่างประเทศบริษัทหนึ่งได้มาลงทุนศึกษาตำราแพทย์พื้นบ้านของไทยและในที่สุดก็พบว่าตำรายาสมุนไพรของไทยใช้ต้นเปล้าน้อยเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวยาในการรักษาโรคเกี่ยวกับท้อง จึงได้นำตัวอย่างพืชไปสกัดทางเคมีและตรวจสอบสรรพคุณทางเภสัชวิทยา โดยได้พบสารชนิดหนึ่งที่มีสรรพคุณในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร และบริษัทดังกล่าวได้จดลิขสิทธิ์วิธีการสกัดสารดังกล่าวและผลิตยารักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารออกมาจำหน่ายได้กำไรมากมาย ทำให้โอกาสที่คนไทยจะได้ประโยชน์จากยาที่สกัดจากภูมิปัญญาดั้งเดิมและพืชดั้งเดิมในท้องถิ่นของเราก็มีน้อยไปโดยปริยาย (วิสุทธิ์, 2538) ในปัจจุบันคนโดยทั่วไปจะคำนึงถึงการมีสุขภาพที่ดี เนื่องจากความเคร่งเครียดจากการทำงาน การรักษาสุขภาพตามวิธีของแพทย์แผนโบราณจะใช้วิธีการบำบัดประสาทสัมผัสทั้งห้าเพื่อให้ผ่อนคลาย เช่น การใช้พันธุ์พืชที่มีกลิ่นหอม ฯลฯ จากองค์ความรู้ทางการแพทย์แผนโบราณ พบว่าโรงพยาบาลอภัยภูเบศร์ได้นำบางส่วนของเรื่องยาพื้นบ้านมาสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจให้กับโรงพยาบาล และปัจจุบันนี้พบว่าพันธุ์ไม้หอมชนิดต่าง ๆ ได้พัฒนาเป็นสินค้าที่มีความต้องการสูงมาก เนื่องจากความต้องการที่จะมีสุขภาพร่างกายที่แข็งแรงทำให้คนมีความสนใจในการใช้วัสดุจากธรรมชาติมากขึ้น ประโยชน์ของสารออกฤทธิ์ที่มีในพืชสามารถใช้ในการรักษาโรคที่น่าสนใจอีกหลายโรค เช่น สารโพรแทน-นิน (protannin) ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งซึ่งสกัดได้จากลูกหว้าที่มีรสฝาด สารแอนโธไซยานิน (anthocyanin) สกัดจากบลูเบอรี่ (blueberry) ซึ่งคนไทยสกัดจากลูกมะเม่าใช้บำรุงสายตา เป็นต้น (สุภาภรณ์, 2546) นอกจากนี้ Debnath and Bisen (2008) กล่าวว่าสบู่ดำเป็นแหล่งของสาร secondary metabolites ที่สำคัญทางการแพทย์ที่มีอยู่ในใบ ผล น้ำยาง และเนื้อไม้ โดยมีสาร glycosides, tannins, phytosterols, flavonoids และ steroidal sapogenins ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ส่วนความเป็นพิษในส่วนต่าง ๆ และสารสำคัญที่มีอยู่ในต้นสบู่ดำ Kumar และ Sharma (2008) รวบรวมข้อมูลของสารพิษและวิธีการล้างพิษไว้ใช้ประโยชน์แล้ว

3. ด้านอุตสาหกรรม

จากการปฏิวัติเขียวซึ่งส่งผลกระทบในการทำลายความหลากหลายของพันธุ์พืชที่ใช้เป็นอาหาร และยังส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุ์พืชในการเกษตร โดยการนำพันธุ์ใหม่ที่ไม่มีความต้านทานโรคเข้ามาเพาะปลูก ดังนั้นเกษตรกรจึงต้องใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงจำนวนมากในการดูแลรักษาพืชปลูก ซึ่งสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงดังกล่าวเป็นสารเคมีที่ฤทธิ์ตกค้างและเป็นอันตรายต่อชีวิตมนุษย์ สัตว์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในปัจจุบันได้มีผู้ให้มีความสนใจสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น เช่น เกษตรกรในแถบแอฟริกาตะวันตกใช้ภูมิปัญญาในการสกัดสารเคมีชนิดหนึ่งจากถั่ว (*Physostigma venenosum*) เพื่อใช้เป็นยาพิษสำหรับฆ่าสัตว์ สารเคมีที่สกัดได้คือ methyl carbamate ซึ่งนำมาใช้เป็นยาฆ่าแมลงได้หลายชนิด ในทวีปอเมริกาใต้พวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

"อินเดียนแดง" ใช้พันธุ์พืชเลื้อยชนิดหนึ่ง (*Lanchocarpus*) ที่ขึ้นอยู่ตามป่าชื้นเขตร้อนเป็นยาเบื่อปลาเพื่อจับปลามาเป็นอาหาร สารเคมีที่สกัดได้จากพืชเลื้อยชนิดนี้คือ rotenone ซึ่งนำมาใช้เป็นสารเคมีกำจัดแมลง และคนไทยรู้จักใช้รากของต้นหางไหล หรือ "โล่ติ๊น" เป็นยาเบื่อปลา และสารเคมีที่สกัดได้จากต้นสะเดาสามารถนำมาใช้เป็นสารฆ่าแมลงศัตรูพืชได้โดยที่ไม่มีผลตกค้างและไม่มีพิษในการทำลายสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ภูมิปัญญาดังกล่าวเป็นที่รู้จักและใช้กันอยู่ในกลุ่มเกษตรกร ในขณะที่ประเทศมหาอำนาจทางอุตสาหกรรมยาและสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงต่าง ๆ เช่น เยอรมนีก็ได้เริ่มลงมือค้นคว้า ลงทุนและเริ่มทำการผลิตสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงจากสะเดาเชิงอุตสาหกรรมไปแล้วในประเทศเพื่อนบ้านของประเทศไทย พันธุ์พืชอีกชนิดหนึ่งคือ ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่นิยมในการนำไปรักษาหรือเป็นส่วนผสมของยาตำรับอื่น ซึ่งมีผลในการรักษาโรคของสตรีที่เกี่ยวกับประจำเดือนหรือมดลูกได้อย่างเห็นผล ซึ่งมีบริษัทยาหลายบริษัทนำไปผลิตเป็นยาสำเร็จรูปมาจำหน่ายทำให้สมุนไพรดังกล่าวราคาสูงขึ้นมากหลายเท่าตัว (ศุภวิทย์, 2546)

ผลผลิตของพืชป่าอีกหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นประโยชน์ทางอุตสาหกรรม เช่น น้ำมันพืชที่ใช้สำหรับปรุงอาหาร และพลังงานทดแทนจากพืช ยางธรรมชาติที่ใช้ในอุตสาหกรรมยางรถยนต์และส่วนประกอบงานด้านไฟฟ้า สารเคมีธรรมชาติที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาและอาหารบำรุงสุขภาพ และเป็นที่ประจักษ์แล้วว่าสารจากธรรมชาติมีคุณสมบัติเหนือกว่าบรรดาสารสังเคราะห์ที่ผลิตได้หรือจากผลพลอยได้ทางอุตสาหกรรมน้ำมันและเคมี ปัจจุบันลักษณะการอุป โภคบริโภคของผู้คนก็นิยมใช้เครื่องอุปโภคบริโภคที่ทำจากวัสดุธรรมชาติ เช่น ยา อาหารเสริม อาหารเพื่อสุขภาพ เครื่องสำอาง เสื้อผ้า ฯลฯ (วิสุทธิ์, 2538)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง

สบู่ดำ 128 accession และพืชใกล้เคียง (outgroup) 4 ชนิด คือ สบู่แดง (*Jatropha gossypifolia* L.) ฝิ่นต้น (*Jatropha multifida* L.) หนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica* Hook.) และปัตตาเวีย (*Jatropha integerrima* Jacq.) (ตารางที่ 1)

2. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางเกษตร

2.1 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการปลูกและบำรุงรักษา

2.1.1 อุปกรณ์เตรียมแปลงปลูก เช่น สายวัดสนาม เหล็กยึดหมุด

2.1.2 วัสดุสำหรับการปลูก เช่น ถุงพลาสติกสีดำ ไม้ไผ่สำหรับค้ำยัน ป้ายชื่อพลาสติก

2.1.3 อุปกรณ์สำหรับการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น ถังฉีดยา จอบ เสียม มีด

2.1.4 สารเคมีสำหรับการปลูกและบำรุงรักษา เช่น ปุ๋ยเคมี สารเคมีกำจัดวัชพืช สารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลง

2.2 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการเก็บข้อมูล

2.2.1 วัสดุสำหรับการเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงตาข่ายพลาสติก ถุงพลาสติก ถุงมือ

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับการเก็บข้อมูล เช่น เครื่องชั่ง เวอร์เนียแบบดิจิตอล กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล ไม้บรรทัด กรรไกร ปากกา ดินสอ

3. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ตู้แช่ -20°c รุ่น FZ-189 GYN (SANYO), water bath รุ่น Isotemp 210 (Fisher Scientific) เครื่อง vortex รุ่น VX100 (LABNET)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสบู่ดำ 128 accession และพืชใกล้เคียง (outgroup) 4 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา

Entry no.	Acc. no.	ชื่อ accession	ที่มา	ส่วนขยายพันธุ์
		<u>กลุ่มประเทศไทย</u>		
1	J2	สบู่ดำ พิษณุโลก	จ.พิษณุโลก	เมล็ด
2	J3	สบู่ดำ สตูล	จ.สตูล	เมล็ด
3	J4	สบู่ดำ นครสวรรค์	อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์	กิ่งปักชำ
4	J11	สบู่ดำ มุกดาหาร	อ.เมือง จ.มุกดาหาร	กิ่งปักชำ
5	J12	สบู่ดำ ระยอง	อ.มาบตาพุด จ.ระยอง	เมล็ด
6	J16	สบู่ดำ พะเยา	อ. เชียงม่วน จ. พะเยา	กิ่งปักชำ
7	J21	สบู่ดำ ประจวบคีรีขันธ์	อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	กิ่งปักชำ
8	J30	สบู่ดำ เชียงใหม่	อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	เมล็ด
9	J31	สบู่ดำ สุรินทร์	จ.สุรินทร์	เมล็ด
10	J47	สบู่ดำ หนองคาย	บ.น้ำมันสบู่ไทย จำกัด จ.หนองคาย	เมล็ด
11	J63	สบู่ดำ กาญจนบุรี	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	กิ่งปักชำ
12	J64	สบู่ดำ เพชรบูรณ์	อ.ชนแดน จ.เพชรบูรณ์	กิ่งปักชำ
13	J65	สบู่ดำ จันทบุรี	อ.สอยดาว จ.จันทบุรี	เมล็ด
14	J66	สบู่ดำ ร้อยเอ็ด	อ.สุวรรณภูมิ จ.ร้อยเอ็ด	เมล็ด
15	J42	สบู่ดำ ปราจีนบุรี	อ.กบินทร์บุรี จ.ปราจีนบุรี	กิ่งปักชำ
16	J40	สบู่ดำ อุทัยธานี	อ.บ้านไร่ จ.อุทัยธานี	กิ่งปักชำ
17	J44	สบู่ดำ มุกดาหาร10KR	จ.มุกดาหาร	กิ่งปักชำ
18	J5	สบู่ดำ ขอนแก่น	จ.ขอนแก่น	กิ่งปักชำ
19	J34	สบู่ดำ ขอนแก่น	จ.ขอนแก่น	กิ่งปักชำ
20	J8	สบู่ดำ แพร่	จ.แพร่	กิ่งปักชำ
21	J19	สบู่ดำ แพร่	จ.แพร่	กิ่งปักชำ
22	J9	สบู่ดำ ปทุมธานี	จ.ปทุมธานี	กิ่งปักชำ
23	J10	สบู่ดำ ปทุมธานี	จ.ปทุมธานี	เมล็ด
24	J15	สบู่ดำ ชัยนาท	อ.เนินขาม จ.ชัยนาท	เมล็ด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Entry no.	Acc. no	.ชื่อ accession	ที่มา	ส่วนขยายพันธุ์
25	J20	สบู่ดำ ชัยนาท	จ.ชัยนาท	กิ่งปักชำ
26	J17	สบู่ดำ นครราชสีมา	มก. (กำแพงแสน) จ.นครปฐม	กิ่งปักชำ
27	J33	สบู่ดำ นครปฐม	ต.สามกระบือเผือก อ.เมือง จ.นครปฐม	เมล็ด
28	J35	สบู่ดำ นครปฐม	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	เมล็ด
29	J13	สบู่ดำ มก.	คณะประมง มก. จ.กรุงเทพฯ	กิ่งปักชำ
30	J22	สบู่ดำ บางเขน	สถาบันวิจัยพืชไร่ จ.กรุงเทพฯ	กิ่งปักชำ
31	J23	สบู่ดำ ใบด่าง	จ.กรุงเทพฯ (คุณสุขสันต์)	กิ่งปักชำ
32	J29	สบู่ดำ 4 เมล็ด	จ.กรุงเทพฯ	กิ่งปักชำ
33	J39	สบู่ดำ อินเดีย	ร้านพันธุ์ไม้เกษตร มก. จ.กรุงเทพฯ	เมล็ด
34	J45	สบู่ดำ สมก.	สโมสรนิสิตเก่า มก. จ.กรุงเทพฯ	เมล็ด
35	J50	สบู่ดำ ศรีลังกา	จ.กรุงเทพฯ (อ.สนั่น)	ติดตา
36	J51	สบู่ดำ อินเดีย	จ.กรุงเทพฯ (อ.สนั่น)	ติดตา
37	J52	สบู่ดำ FF25B-14	จ.กรุงเทพฯ (อ.สนั่น)	ติดตา
38	J53	สบู่ดำ FF20-Sbr-3	จ.กรุงเทพฯ (อ.สนั่น)	ติดตา
39	J54	สบู่ดำ E-L-23	จ.กรุงเทพฯ (อ.สนั่น)	ติดตา
40	J132	สบู่ดำสุขสันต์ (De)	เขตบางเขน จ.กรุงเทพฯ	กิ่งปักชำ
41	J56	สบู่ดำ ลำปาง	ม.เทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ.ลำปาง (ดร.ชำนาญ)	เมล็ด
42	J57	สบู่ดำ ลำปาง	ม.เทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ.ลำปาง (คุณอดิศักดิ์)	เมล็ด
43	J58	สบู่ดำ ลำปาง	ม.เทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ.ลำปาง (คุณจิตตา)	เมล็ด
44	J59	สบู่ดำ ลำปาง	ม.เทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ.ลำปาง (คุณอ้วน)	เมล็ด
45	J60	สบู่ดำ ลำปาง	ม.เทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ.ลำปาง (คุณเผชิญ)	เมล็ด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Entry no.	Acc. no.	ชื่อ accession	ที่มา	ส่วนขยายพันธุ์
46	J32	สบู่ดำ นครราชสีมา	อ.พิมาย จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
47	J37	สบู่ดำ นครราชสีมา	อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา(คุณเจริญ)	กิ่งปักชำ
48	J41	สบู่ดำ นครราชสีมา	อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา	เมล็ด
49	J46	สบู่ดำ นครราชสีมา	อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
50	J49	สบู่ดำ นครราชสีมา	เขตดินเค็ม อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
51	J18	สบู่ดำ นครราชสีมา	จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
52	J24	สบู่ดำ KUBP 16	บ.โนนปอแดง อ.ยางตลาด จ.กาฬสินธุ์	กิ่งปักชำ
53	J25	สบู่ดำ KUBP 20-1	บ.โนนก่อ อ.นิคมคำสร้อย จ.มุกดาหาร	กิ่งปักชำ
54	J26	สบู่ดำ KUBP 21-7	บ.โพธิ์ไทร อ.ดอนตาล จ.มุกดาหาร	กิ่งปักชำ
55	J27	สบู่ดำ KUBP	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
56	J67	สบู่ดำ KUBP 1-9	บ.โคกระหาด อ.ขามทะเลสอ จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
57	J68	สบู่ดำ KUBP 2-6	บ.หนองกระจง 1 อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
58	J69	สบู่ดำ KUBP 3-10	บ.หนองกระจง 2 อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
59	J70	สบู่ดำ KUBP 4-8	บ.หนองกระจง 3 อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
60	J71	สบู่ดำ KUBP 5-10	ต.ขนงพระ อ.ปักธงชัย จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
61	J72	สบู่ดำ KUBP 6-8	บ.ใหม่สำโรง 1 อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
62	J73	สบู่ดำ KUBP 7-6	บ.ใหม่สำโรง 2 อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
63	J74	สบู่ดำ KUBP 8-5	บ.ใหม่ศรีอุดม อ.หนองบุนนาก จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
64	J75	สบู่ดำ KUBP 9-8	บ.โคกโจด อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมา	กิ่งปักชำ
65	J76	สบู่ดำ KUBP 12-1	บ.สระนคร อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม	กิ่งปักชำ
66	J77	สบู่ดำ KUBP 13-1	อ.บรบือ จ.มหาสารคาม	กิ่งปักชำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Entry no.	Acc. no.	ชื่อ accession	ที่มา	ส่วนขยายพันธุ์
67	J78	สบู่ดำ KUBP 14-5	บ.หนองลมพุก อ.ยางตลาด จ.กาฬสินธุ์	กิ่งปักชำ
68	J79	สบู่ดำ KUBP 15-3	บ.ด่านใต้ อ.ร่องคำ จ.กาฬสินธุ์	กิ่งปักชำ
69	J80	สบู่ดำ KUBP 18-3	บ.หนองม่วง อ.โพนทอง จ.ร้อยเอ็ด	กิ่งปักชำ
70	J81	สบู่ดำ KUBP 19-9	บ.หนองแข้ อ.หนองพอก จ.ร้อยเอ็ด	กิ่งปักชำ
71	J82	สบู่ดำ KUBP 23-7	บ.กุดชุม อ.กุดชุม จ.ยโสธร	กิ่งปักชำ
72	J83	สบู่ดำ KUBP 24-2	บ.โคกยาว อ.ทรายมูล จ.ยโสธร	กิ่งปักชำ
73	J84	สบู่ดำ KUBP 25-3	บ.กุดแห่ อ.เลิงนกทา จ.ยโสธร	กิ่งปักชำ
74	J85	สบู่ดำ KUBP 27-4	บ.หนองคูณ อ.เขมราฐ จ. อุบลราชธานี	กิ่งปักชำ
75	J86	สบู่ดำ KUBP 28-4	บ.หนองกวาง อ.เขื่องใน จ.อุบลราชธานี	กิ่งปักชำ
76	J87	สบู่ดำ KUBP 29-4	บ.ยางโยภาพ อ.ม่วงสามสิบ จ.อุบลราชธานี	กิ่งปักชำ
77	J88	สบู่ดำ KUBP 30-2	บ.โพธิ์ไทย อ.ประโคนชัย จ.บุรีรัมย์	กิ่งปักชำ
78	J89	สบู่ดำ KUBP 31-2	บ.โคกสะอาด อ.ละหานทราย จ.บุรีรัมย์	กิ่งปักชำ
79	J90	สบู่ดำ KUBP 32-6	บ.หนองทะนง อ.ปราสาท จ.สุรินทร์	กิ่งปักชำ
80	J91	สบู่ดำ KUBP 33-1	บ.ตาคง อ.สังขะ จ.สุรินทร์	กิ่งปักชำ
81	J92	สบู่ดำ KUBP 34-8	บ.ไก่ดำ อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ	กิ่งปักชำ
82	J93	สบู่ดำ KUBP 35-4	บ.ศรีสมบูรณ์ อ.ชานุมาน จ.อำนาจเจริญ	กิ่งปักชำ
83	J94	สบู่ดำ KUBP 36-2	บ.ผักขะ อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ	กิ่งปักชำ
84	J95	สบู่ดำ KUBP 37-3	บ.หนองคู อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ	กิ่งปักชำ
85	J96	สบู่ดำ KUBP 38-1	บ.ศาลาเหนือ อ.ขุนตาล จ.ศรีสะเกษ	กิ่งปักชำ
86	J97	สบู่ดำ KUBP 39-1	บ.หนองโพธิ์ อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ	กิ่งปักชำ
87	J98	สบู่ดำ KUBP 43-2	บ.ปอแดง อ.มหาชนะชัย จ.ยโสธร	กิ่งปักชำ
88	J99	สบู่ดำ KUBP 45	ต.หนองไผ่ อ. หนองไผ่ จ.เพชรบูรณ์	กิ่งปักชำ
89	J100	สบู่ดำ KUBP 46	ต.วังศาล อ.วังโป่ง จ.เพชรบูรณ์	กิ่งปักชำ
90	J101	สบู่ดำ KUBP 47	ต.ท้ายดง อ.วังโป่ง จ.เพชรบูรณ์	กิ่งปักชำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Entry no.	Acc. no.	ชื่อ accession	ที่มา	ส่วนขยายพันธุ์
91	J102	สบู่ดำ KUBP 49	ต.บ่อทอง อ.ทองแสนขัน จ.อุตรดิตถ์	กิ่งปักชำ
92	J103	สบู่ดำ KUBP 58	บ.ห้วยเฟือง ต.ผาช้างน้อย อ.ปง จ.พะเยา	กิ่งปักชำ
93	J104	สบู่ดำ KUBP 52	บ.ปางมอญ ต.อ่ายนาไลย อ.เวียงสา จ. น่าน	กิ่งปักชำ
94	J105	สบู่ดำ KUBP 56	บ.น้ำโมง ต.ฝาตอ อ.ท่าวังผา จ.น่าน	กิ่งปักชำ
95	J106	สบู่ดำ KUBP 57	ต.นาไร่หลวง อ.สองแคว จ.น่าน	กิ่งปักชำ
96	J107	สบู่ดำ KUBP 62-3	บ.น้ำจำ ต.หลวงใต้ อ.งาว จ.ลำปาง	กิ่งปักชำ
97	J108	สบู่ดำ KUBP 63-1	บ.ท่าสี ต.บ้านดง อ.แม่เมาะ จ.ลำปาง	กิ่งปักชำ
98	J109	สบู่ดำ KUBP 67	บ.ตาก ต.ตากออก อ.บ้านตาก จ.ตาก	กิ่งปักชำ
99	J110	สบู่ดำ KUBP 64-3	บ.ต้นมื่น ต.วังพร้าว อ.เกาะคา จ.ลำปาง	กิ่งปักชำ
100	J111	สบู่ดำ KUBP 65	บ.สันบุญเรือง ต.แม่กัว อ.สบปราบ จ.ลำปาง	กิ่งปักชำ
101	J112	สบู่ดำ KUBP 66-2	บ.แม่วะเด่นชัย ต.แม่วะ อ.เถิน จ.ลำปาง	กิ่งปักชำ
102	J113	สบู่ดำ KUBP 69-1	ม.3 อ.เมือง จ.เพชรบุรี	กิ่งปักชำ
103	J114	สบู่ดำ KUBP 71-5	บ.ป่า อ.บ้านลาด จ.เพชรบุรี	กิ่งปักชำ
104	J115	สบู่ดำ KUBP 72-3.	บ.ห้วยจิก อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี	กิ่งปักชำ
105	J116	สบู่ดำ KUBP 73-1	ม.7 บ้านบ่อนอก อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์	กิ่งปักชำ
106	J117	สบู่ดำ KUBP 74-1	ม.2 บ้านบางน้ำจืด อ.หลังสวน จ.ชุมพร	กิ่งปักชำ
107	J118	สบู่ดำ KUBP 75-8	ม.2 สี่แยกบ้านนาเดิม อ.บ้านนาเดิม จ.สุราษฎรธานี	กิ่งปักชำ
108	J119	สบู่ดำ KUBP 76-5	บ.นายาง อ.บ้านนาสาร จ.สุราษฎรธานี	กิ่งปักชำ
109	J120	สบู่ดำ KUBP 77-8	ม.7 บ้านไร่เหนือ อ.ทุ่งส่ง จ.สุราษฎรธานี	กิ่งปักชำ
110	J121	สบู่ดำ KUBP 78-9	ม.1 อ.ชะอวด จ.นครศรีธรรมราช	กิ่งปักชำ
111	J122	สบู่ดำ KUBP 79-2	บ.ปังยา(วัดเขาแดง) อ.เมือง จ.พัทลุง	กิ่งปักชำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Entry no.	Acc. no.	ชื่อ accession	ที่มา	ส่วนขยายพันธุ์
112	J123	สบู่ดำ KUBP 80-3	ม.6 บ้านประดู่ อ.เมือง จ.พัทลุง	กิ่งปักชำ
113	J124	สบู่ดำ KUBP 81-1	ม.2 สถานีอนามัยบ้านป่าบาก อ.ป่าบอน จ.พัทลุง	กิ่งปักชำ
114	J125	สบู่ดำ KUBP 83-5	เขตเทศบาล อ.เมือง จ.ปัตตานี	กิ่งปักชำ
115	J126	สบู่ดำ KUBP 84-3.	ม.บ้านควนลังกา อ. โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี	กิ่งปักชำ
116	J127	สบู่ดำ KUBP 85-4	ม.11 อ.รัตภูมิ จ.สงขลา	กิ่งปักชำ
117	J128	สบู่ดำ KUBP 86-2	ม.21 อ.วังวิเศษ จ.ตรัง	กิ่งปักชำ
118	J129	สบู่ดำ KUBP 87-1	ม.2 คลองท่อม จ.กระบี่	กิ่งปักชำ
			<u>กลุ่มต่างประเทศ</u>	
119	J6	สบู่ดำ อินเดีย	ประเทศอินเดีย	เมล็ด
120	J28	สบู่ดำ D1 อินเดีย	ประเทศอินเดีย	กิ่งปักชำ
121	J36	สบู่ดำ อินเดีย	ประเทศอินเดีย	เมล็ด
122	J48	สบู่ดำ อินเดีย	Chennai ประเทศอินเดีย	เมล็ด
123	J131	สบู่ดำศรีลังกา	ประเทศศรีลังกา	กิ่งปักชำ
124	J55	สบู่ดำ จีน	ประเทศจีน (อ.กิตติ)	เมล็ด
125	J14	สบู่ดำ ลาว	ประเทศลาว	เมล็ด
126	J7	สบู่ดำ สหรัฐอเมริกา	ประเทศสหรัฐอเมริกา	กิ่งปักชำ
127	J38	สบู่ดำ สหรัฐอเมริกา	รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา	กิ่งปักชำ
128	J130	สบู่ดำ Suriname	Suriname (คุณพิชัย มณีโชติ)	เมล็ด
			<u>กลุ่มพืชใกล้เคียง</u>	
129	J1	สบู่แดง (*J. gossypifolia*)	จ.กรุงเทพฯ	เมล็ด
130	J43	ฝิ่นต้น *(J. multifida*)	จ.กรุงเทพฯ	เมล็ด
131	J61	หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*)	จ.กรุงเทพฯ	เมล็ด
132	J62	ปัตตาเวีย (*J. integgerima*)	จ.กรุงเทพฯ	กิ่งปักชำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (refrigerated centrifuge) รุ่น 3K20 (SIGMA) เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge) รุ่น 1010 (Century Scientific) ชุดโกร่งบดตัวอย่าง

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่อง PCR รุ่น PTC-100™ (MJ Research, Inc.)

3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้แก่ ชุดอิเล็กโทรฟอรีซิสแนวตั้ง (vertical electrophoresis) รุ่น V20-CDC (SCIE-PLAS)

3.1.4 เครื่องมือที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอ ได้แก่ ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis (Syngen) เครื่องฉายแสง UV และเครื่องถ่ายภาพใช้แสงอัลตราไวโอเลต (gel documentation) รุ่น TXT-20.M (Vilber Lourmat) เครื่อง spectrophotometer รุ่น Lambda UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer)

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ไนโตรเจนเหลว, 3x CTAB (ethyl trimethyl ammonium bromide) buffer (3% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 m M EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1% polyvinylpyrrolidone (PVP), beta-mercaptoethanol, 10% CTAB ใน 0.7 M NaCl, chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) โดยปริมาตร, 70% ethanol, 10 mg/ml RNase A (US Biological) และ TE buffer (10 : 0.1 = 10 mM Tris pH 8.0 : 0.1 mM EDTA)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แก่ 10x PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 50 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTP (Fermentus) เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 5 pmol AFLP primer และน้ำกลั่นบริสุทธิ์

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้แก่ agarose gel (ISC Bioexpress) loading dye (0.15% bromphenol blue ใน 50% glycerol), 1x-TBE buffer (10.8g Tris base, 5.5g boric acid และ 4 ml 500 mM EDTA pH 8.0)

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสได้แก่ 0.5 mg/ml ethidium bromide (Bio Basic), 10% acetic acid, 0.2% silver nitrate, 2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 µg/ml sodium thiosulfate และ 3%gylcerol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การรวบรวมพันธุ์สบู่ดำ

รวบรวมพันธุ์สบู่ดำจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งภายในและนอกประเทศจำนวน 128 accession และพืชที่เป็น outgroup 4 ชนิดแล้วปลูกไว้ในแปลงปลูกรวบรวมพันธุ์สบู่ดำ ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ

2. การปลูกสบู่ดำ

2.1 การเตรียมท่อนพันธุ์สบู่ดำ คัดเลือกกิ่งที่มีความสมบูรณ์ไม่ถูกโรคและแมลงทำลาย มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร ตัดเป็นท่อนยาว 20-25 เซนติเมตร ทาบริเวณรอยแผลที่ตัดด้วยสารเคมีป้องกันเชื้อราแล้วผึ่งให้แห้งก่อนปักชำ ภายหลังการปักชำไปนาน 10-12 สัปดาห์ ตาที่ข้อของกิ่งปักชำจะงอกเป็นต้นอ่อน นำต้นอ่อนที่ได้ไปปลูกในแปลงทดลอง

2.2 การปลูก นำต้นอ่อนที่ได้จากการปักชำสบู่ดำ 128 accession ปลูกในแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา วางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) ทำ 3 ซ้ำ ระยะระหว่างแถว 3 เมตร ระยะระหว่างต้น 1.5 เมตร แต่ละ accession ปลูก 1 แถว ๆ ละ 5 ต้น ให้น้ำทุก 2 สัปดาห์ และปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ สลับกับปุ๋ยยูเรียสูตร 46-0-0 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ ประมาณ 60 วันต่อครั้ง

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตร

บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสบู่ดำจำนวน 3 ต้นที่อยู่ตรงกลางแถวจากทั้งหมด 5 ต้นของแต่ละ accession ลักษณะที่บันทึกข้อมูลมีดังนี้

3.1 ใบ (leaf) สุ่มเก็บใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ จำนวน 3 ใบต่อต้น

3.1.1 สีใบ เช่น ใบมีสีเขียว สีเขียวสลับขาว (ใบลาย)

3.1.2 รูปร่างใบ เช่น รูปหยัก (palmately) รูปหัวใจ (heart-shaped)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.3 จำนวนรอยหยัก (no. of lobes / leaf) นับจำนวนหยัก (lobe) บนแผ่นใบ

3.2 ลักษณะการแตกกิ่ง (branching) การแตกกิ่งแรกออกจากลำต้น โดยอาจแตกออกเป็น 2, 3 หรือ 4 กิ่ง

3.3 รูปทรงช่อดอก (type of inflorescence) เช่น แบบ cyme คือดอกเป็นช่อลดหลั่นกัน ดอกตัวผู้อยู่ปลายกิ่งของช่อดอกและดอกตัวเมียอยู่ระหว่างกิ่งของช่อดอก หรือแบบอื่น ๆ

3.4 ผล (fruit) สุ่มเก็บผลจำนวน 5 ผลต่อต้น

3.4.1 รูปร่างผล เช่น กลมป้อม กลมรี

3.4.2 สีผล ตรวจสอบสีผลในระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) สีผลของสบู่ดำในระยะนี้โดยทั่วไปมีสีเหลือง แต่อาจมีสีอื่นได้ เช่น สีแดง สีส้ม

3.5 เมล็ด (seed) สุ่มเก็บเมล็ดจำนวน 5 เมล็ดต่อต้น

3.5.1 รูปร่างเมล็ด เช่น รูปสี่เหลี่ยม รูปไข่

3.5.2 สีเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) เช่น สีดำ น้ำตาลดำ

4. การศึกษาลักษณะทางเกษตร

บันทึกลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำจำนวน 3 ต้นที่อยู่ตรงกลางแถวจากทั้งหมด 5 ต้นของแต่ละ accession ลักษณะที่บันทึกข้อมูลมีดังนี้

4.1 ใบ (leaf) สุ่มเก็บใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จำนวน 3ใบต่อต้น

4.1.1 ความยาวใบ (leaf length) วัดจากฐานแผ่นใบที่ติดกับก้านใบจนถึงปลายแผ่นใบ (เซนติเมตร)

4.1.2 ความกว้างใบ (leaf width) วัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของแผ่นใบ (เซนติเมตร)

4.1.3 ความยาวก้านใบ (petiole length) วัดจากก้านใบที่ติดกับฐานแผ่นใบจนถึงปลายก้านใบที่ติดกับกิ่ง (เซนติเมตร)

4.2 ลำต้น (stem)

4.2.1 ความสูงต้น (stem height) วัดจากโคนต้นถึงปลายพุ่มโดยวัดหลังจากที่ต้นให้ช่อผลช่อสุดท้ายแล้ว (เมตร)

4.2.2 จำนวนกิ่งแรกต่อต้น (no. of primary branches / plant) นับจำนวนกิ่งที่แยกออกมาจากลำต้นหลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2.3 จำนวนกิ่งรองต่อต้น (no. of secondary branches /plant) นับจำนวนกิ่งที่แยกออกจากกิ่งแรก

4.3 ช่อดอกและดอก (inflorescence and flower)

4.3.1 อายุวันออกดอก (no. of days to flowering) นับตั้งแต่วันเพาะกิ่งชำจนถึงวันที่ช่อดอกที่ 12 มีดอกแรกบาน

4.3.2 จำนวนช่อดอกต่อต้น (no. of inflorescences / plant) โดยนับช่อดอกทั้งหมดของต้นที่เกิดขึ้นตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม 2551

4.3.3 จำนวนดอกตัวเมียต่อช่อดอก (no. of pistillate flowers/ inflorescence) สุ่มช่อดอกจำนวน 2 ช่อต่อต้น คลุมช่อดอกด้วยถุงตาข่าย เมื่อดอกบานจึงตัดช่อดอกจากต้นนำมานับจำนวนดอกตัวเมีย

4.3.4 จำนวนดอกตัวผู้ต่อช่อดอก (no. of staminate flowers/inflorescence) สุ่มช่อดอกจำนวน 2 ช่อต่อต้น ทำเช่นเดียวกับข้อ 3 แล้วนับจำนวนดอกตัวผู้ในช่อดอก

4.3.5 สัดส่วนดอกตัวเมียต่อดอกตัวผู้ (ratio of pistillate and staminate flower) คำนวณได้จาก

$$\frac{\text{จำนวนดอกตัวเมีย/ช่อดอก}}{\text{จำนวนดอกตัวผู้/ช่อดอก}}$$

4.4 ผล (capsule) เก็บเกี่ยวช่อผลทั้งหมดของแต่ละต้นที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) ในช่วงฤดูฝนตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม 2551 และบันทึกข้อมูล ดังนี้

4.4.1 จำนวนช่อผลต่อต้น (no. of capsule clusters/plant) นับจำนวนช่อผลทั้งหมดของแต่ละต้น

4.4.2 จำนวนผลต่อต้น (no. of capsules/plant) นับจำนวนผลทั้งหมดของแต่ละต้น

4.4.3 จำนวนผลต่อช่อ (no. of capsules/ capsule cluster) คำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนผล/ต้น}}{\text{จำนวนช่อผล/ต้น}}$$

4.4.4 เปอร์เซ็นต์การติดผล (capsule setting) คำนวนจาก

$$\frac{\text{จำนวนผล/ช่อ} \times 100}{\text{จำนวนดอกตัวเมีย/ช่อ}}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.4.5 ขนาดผล (capsule size) สุ่มผลจำนวน 5 ผลต่อต้น นำมาวัดขนาดดังนี้

4.4.5.1 ความยาวผล วัดจากขั้วผลถึงปลายผล (เซนติเมตร)

4.4.5.2 ความกว้างผล วัดส่วนที่กว้างที่สุดของผล (เซนติเมตร)

4.4.6. จำนวนพูต่อผล (no. of lodicule/ capsule) นำผลที่ผ่านการวัดขนาดมาแกะนับจำนวนพูต่อผล

4.5 เมล็ด (seed) กะเทาะเมล็ดออกจากผลที่เก็บเกี่ยวได้ทั้งหมดของแต่ละต้นผึ่งให้แห้ง และบันทึกข้อมูลดังนี้

4.5.1 ขนาดเมล็ด (seed size) สุ่มเมล็ดจำนวน 5 เมล็ดต่อต้น นำมาวัดขนาด ดังนี้

4.5.1.1 ความยาวเมล็ด วัดจากรอยต่อระหว่างเมล็ดกับ caruncle จนถึงส่วนปลายสุดของเมล็ด (มิลลิเมตร)

4.5.1.2 ความกว้างเมล็ด วัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของเมล็ด (มิลลิเมตร)

4.5.1.3 ความหนาเมล็ด วัดจากส่วนที่หนาที่สุดของเมล็ด (มิลลิเมตร)

4.5.2 น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (seed weight/plant) ชั่งน้ำหนักเมล็ดทั้งหมดของแต่ละต้นแล้วปรับเป็นน้ำหนักเมล็ดต่อต้นที่ความชื้น 15%

4.5.3 น้ำหนัก 100 เมล็ด (100 seed weight) สุ่มเมล็ดมาจำนวน 100 เมล็ด ชั่งน้ำหนัก (กรัม) แล้วปรับเป็นน้ำหนัก 100 เมล็ดที่ความชื้น 15%

4.5.4 ความชื้นของเมล็ด (moisture of seed) คือปริมาณน้ำที่มีอยู่ในเมล็ดพืช เมล็ดพืชประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นน้ำหนักแห้งของเมล็ดพืชซึ่งมีค่าคงที่ กับส่วนที่เป็นน้ำหนักของน้ำ โดยส่วนน้ำหนักของน้ำในเมล็ดจะมีการเปลี่ยนแปลง ปริมาณความชื้นในเมล็ดจะบอกเป็นเปอร์เซ็นต์ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร (วิบูลย์, 2552) ดังนี้

$$\text{ความชื้นเมล็ด(\%)} = \frac{w_w - w_d}{w_w} \times 100$$

w_w = น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ

w_d = น้ำหนักเมล็ดหลังอบ

การหาความชื้นของเมล็ด เริ่มจากการสุ่มเมล็ดจำนวน 10 เมล็ด ชั่งเมล็ดก่อนอบและหลังอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 103±2°ซ เป็นเวลา 17±1 ชั่วโมง และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นด้วยสูตรข้างต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.5.6 ผลผลิตเมล็ด (seed yield) (กิโลกรัม/ไร่) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{ผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักเมล็ดต่อต้นที่ความชื้น 15\%}}{} \times 365 \text{ ต้น}$$

หมายเหตุ ในการทดลองครั้งนี้ปลูกสบู่ดำโดยใช้ระยะปลูก 3 x 1.5 เมตร จึงมีจำนวนต้นทั้งหมด 356 ต้นต่อไร่

5. การเก็บตัวอย่างใบ

เลือกเก็บใบอ่อนของสบู่ดำ 128 accession และพืชที่เป็น outgroup 4 ชนิด เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากแปลงรวบรวมพันธุ์ทั้ง 3 แห่ง โดยการคัดเลือกใบที่ไม่ถูกโรคและแมลงทำลายใบที่ยังอ่อนอยู่ซึ่งจะสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณมาก เพราะว่าใบที่ยังอ่อนจะมีส่วนของเซลล์ที่ช่วยให้ความแข็งแรงอยู่น้อย ได้แก่ collenchyma และ scherenchyma ซึ่งประกอบด้วย fiber และ sclereid จำนวนน้อยและมีปริมาณของเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตจำนวนมาก ซึ่งจะทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มากไปด้วย (เทียมใจ, 2546)

6. การสกัดดีเอ็นเอจากใบ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนสบู่ดำโดยใช้วิธีการที่ประยุกต์จาก Molecular Biology Laboratory Protocols (2002) โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้

6.1 เตรียมสารละลาย 3x CTAB [3% CTAB (w/v),100 mM tris_HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP (Polyvinylpyrrolidone)] ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติม beta-mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

6.2 บดใบอ่อนสบู่ดำในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลว ตักส่วนใบที่บดแล้วประมาณ 2 กรัม ใส่ในหลอดและเขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และยกหลอดออกปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3 แบ่งสารละลายใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 750 ไมโครลิตร เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) หลอดละ 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน เป็นเวลา 10 นาที

6.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 20 นาที

6.5 ดูดสารละลายใสตอนบนใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นหลอดใหม่หลอดละ 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 10% CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

6.6 เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) หลอดละ 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที

6.7 ดูดสารละลายใสตอนบนหลอดละ 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่รวมให้ได้หลอดละ 600 ไมโครลิตร

6.8 ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม absolute ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ

6.9 เกี่ยวดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้วปลายงอที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แต่ถ้าตะกอนดีเอ็นเอที่ได้น้อยไม่สามารถเกี่ยวได้ ให้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

6.10 ล้างตะกอนด้วย 70% และ 90% ethanol ตามลำดับ ปล่อยให้ตะกอนแห้ง

6.11 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE (tris-EDTA) buffer (1:0.1) 100 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ RNase A (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) หลอดละ 2-4 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ(ribonucleic acid, RNA) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวัดการดูดกลืนแสง และตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอใช้งานต่อไป

7. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนมาตรวจความบริสุทธิ์โดยวิธีที่ประยุกต์จาก Dellaporta *et al.*(1983) ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นโดยประมาณ 2-3 ไมโครกรัมต่อกรัม ของน้ำหนักสด ซึ่งวิธีการตรวจสอบมีรายละเอียดดังนี้

7.1 การตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยใช้ agarose gel เพื่อเป็นตัวกลางในการกรองดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้ความเข้มข้น 0.8% และใช้สารละลาย 1x TBE buffer เป็นตัวนำกระแสไฟฟ้า มีความต่างศักย์ของไฟฟ้า 100 โวลต์ (v) เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ethidium bromide นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 5 นาที ตรวจสอบผลใต้แสงอัลตราไวโอเลต (uv) ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ การแตกหักของดีเอ็นเอ การปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอ โปรตีนและสารอื่น ๆ และการคาดคะเนปริมาณดีเอ็นเออย่างหยาบ ๆ

7.2 การตรวจสอบโดยการวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometry) โดยใช้เครื่อง lamda UV/VIS spectrophotometer วัดการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ เพื่อคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอ

การคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ มีหลักการว่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตของกรดนิวคลีอิคจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดที่ 260 นาโนเมตร โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (absorbance, A_{260}) เท่ากับ 20 หน่วย (absorbance, A_{260}) จึงคำนวณหาค่าปริมาณดีเอ็นเอหรือกรดนิวคลีอิคได้ ดังนี้

ปริมาณกรดนิวคลีอิค (ไมโครกรัม / ไมโครลิตร) $= A_{260} \times 1/20$

ปริมาณกรดนิวคลีอิค (นาโนกรัม / ไมโครลิตร) $= A_{260} \times 1/20 \times 100$

$= A_{260} \times 5$

หากใช้สารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางในการตรวจสอบ 100 เท่า (ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร ต่อน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร)สามารถคำนวณหาได้ ดังนี้

ปริมาณกรดนิวคลีอิค (นาโนกรัม / ไมโครลิตร) $= A_{260} \times 5 \times 100$

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ค่าอัตราการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 มิลลิเมตร (A_{260}/A_{280}) ใช้บอกคุณภาพดีเอ็นเอว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์เหมาะสำหรับนำไปใช้ แต่ถ้าค่าสูงกว่า 1.85 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเออยู่มาก และถ้าได้ค่าต่ำกว่า 1.65 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่มาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำด้วยเทคนิค AFLP และ ISSR

8.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI (G/AATTC) และ *Mse*I (T/TAA)

8.1.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำโดยเทคนิค AFLP ตามวิธีการของ Vos *et al*. (1995) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของ adapter ที่ใช้ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Adapter	ลำดับเบส
*Eco*RI adapter	5′ -CTCGTAGACTGCGTACC- 3′ 3′-CATCTGACGCATGGTTAA-5′
*Mse*I adapter	5′ -GACGATGAGTCCTGAG- 3′ 3′-TACTCAGGACTCAT- 5′

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอต้นแบบ (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2.5
H_2O	36.05
*Eco*RI (10 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.25
*Mse*I (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.5
*Eco*RI adapter (5 พิโคลโมล/ไมโครลิตร)	1.0
*Mse*I adapter (5 พิโคลโมล/ไมโครลิตร) หรือ *Msp*I adapter	2.0
10x buffer R^+	2.5
10x T_4 ligase buffer	5.0
T_4 DNA ligase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.2
รวม	50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.1.1.1 การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ชุดที่ 1 หรือชุดที่ 2 และเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอทั้งสองด้านด้วย adapter ที่จำเพาะกับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ (ตารางที่ 2) ร่วมกับสารเคมีในปฏิกิริยา (ตารางที่ 3) โดยผสมสารเคมีต่าง ๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำอุ่น (water bath) หรือในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์+1 ที่ใช้ในการทำ preselective amplification ของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชุดที่ 1

ไพรเมอร์+1	ลำดับเบส
Primer E+1 (E-A)	5' GACTGCGTACCAATTCA 3'
Primer E+1 (E-C)	5' GACTGCGTACCAATTCC 3'
Primer M+1 (M-C)	5' GATGAGTCCTGAGTAAC 3'
Primer M+1 (M-A)	5' GATGAGTCCTGAGTAAA 3'

8.1.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR มี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกได้แก่

Preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ *Eco*RI primer และ *Mse*I primer ที่เพิ่มเบสที่ช่วยในการคัดเลือก 1 ตัวที่ปลาย 3′ (primer E+1 และ primer M+1) (ตารางที่ 4) ร่วมกับสารเคมีในปฏิกิริยา PCR (ตารางที่ 5) โดยผสมสารเคมีต่าง ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 25 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อได้ผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) ที่เพิ่มปริมาณแล้ว ให้แบ่งดีเอ็นเอส่วนหนึ่งมาตรวจสอบปริมาณด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% และแบ่งดีเอ็นเออีกส่วนหนึ่งมาทำให้เจือจาง 20 เท่า ด้วยสารละลาย TE เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR ขั้นที่ 2 (selective amplification) ส่วนดีเอ็นเอที่เหลือให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในการทำ preselective amplification

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์และเชื่อมต่อกับ adapter	2.0
H_2O	15.15
dNTP mix (2 มิลลิโมลาร์)	2.5
10x PCR buffer	2.5
$MgCl_2$ (50 มิลลิโมลาร์)	0.75
Primer E+1 (5 พิโคลโมล/ ไมโครลิตร)	1.0
Primer M+1 (5 พิโคลโมล/ ไมโครลิตร)	1.0
Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.1
รวม	25

Selective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ *Eco*R I primer และ *Mse* I primer ที่เพิ่มเบสที่ช่วยในการคัดเลือก 3 ตัวที่ปลาย 3′ (Primer E+3 และ Primer M+3) (ตารางที่ 6) ร่วมกับสารเคมีในปฏิกิริยา PCR (ตารางที่ 7) โดยผสมสารเคมีต่าง ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย 25 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที รอบสุดท้ายเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.1.1.3 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel เตรียมกระจกสำหรับเทเจล โดยเช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 2 ไมโครลิตร glacial acetic acid 5 ไมโครลิตร และ 95% เอธานอล 1 มิลลิลิตร) และกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่าย เช็ดให้ทั่วด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที หลังจากนั้นนำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ลำดับเบสของไพรเมอร์ + 3 ที่ใช้ในการทำ selective amplification

ไพรเมอร์+3	ลำดับเบส
Primer E+3 (E-AAC)	5' GACTGCGTACCAATTCAAC 3'
Primer E+3 (E-AAG)	5' GACTGCGTACCAATTCAAG 3'
Primer E+3 (E-ACA)	5' GACTGCGTACCAATTCACA 3'
Primer E+3 (E-ACC)	5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'
Primer E+3 (E-ACG)	5' GACTGCGTACCAATTCACG 3'
Primer E+3 (E-ACT)	5' GACTGCGTACCAATTCACT 3'
Primer E+3 (E-AGC)	5' GACTGCGTACCAATTCAGC 3'
Primer E+3 (E-AGG)	5' GACTGCGTACCAATTCAGG 3'
Primer E+3 (E-CAA)	5' GACTGCGTACCAATTCCAA 3'
Primer E+3 (E-CAC)	5' GACTGCGTACCAATTCCAC 3'
Primer E+3 (E-CAG)	5' GACTGCGTACCAATTCCAG 3'
Primer M+3 (M-CAA)	5' GATGAGTCCTGAGTAACAA 3'
Primer M+3 (M-CAC)	5' GATGAGTCCTGAGTAACAC 3'
Primer M+3 (M-CAG)	5' GATGAGTCCTGAGTAACAG 3'
Primer M+3 (M-CAT)	5' GATGAGTCCTGAGTAACAT 3'
Primer M+3 (M-CTA)	5' GATGAGTCCTGAGTAACTA 3'
Primer M+3 (M-CTC)	5' GATGAGTCCTGAGTAACTC 3'
Primer M+3 (M-CTG)	5' GATGAGTCCTGAGTAACTG 3'
Primer M+3 (M-CTT)	5' GATGAGTCCTGAGTAACTT 3'
Primer M+3 (M-AGA)	5' GATGAGTCCTGAGTAAAGA 3'
Primer M+3 (M-ATA)	5' GATGAGTCCTGAGTAAATA 3'
Primer M+3 (M-AAG)	5' GATGAGTCCTGAGTAAAAG 3'
Primer M+3 (M-ACG)	5' GATGAGTCCTGAGTAAACG 3'
Primer M+3 (M-AGG)	5' GATGAGTCCTGAGTAAAGG 3'
Primer M+3 (M-AAT)	5' GATGAGTCCTGAGTAAAAT 3'

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในการทำ selective amplification

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอจาก preselective amplification เจือจาง 20 เท่า	5.0
H_2O	8.3
dNTP mix (2 มิลลิโมลาร์)	2.0
10x PCR buffer	2.5
$MgCl_2$ (50 มิลลิโมลาร์)	0.6
Primer E+1 (5 พิโคลโมล/ ไมโครลิตร)	1.0
Primer M+1 (5 พิโคลโมล/ ไมโครลิตร)	1.0
Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.1
รวม	20

อยู่คงที่ เตรียม 6% acrylamide gel ที่มีส่วนประกอบดังนี้ urea 27 กรัม 10X TBE 6 มิลลิลิตร APS ความเข้มข้น 6 % 600 ไมโครลิตร 30 % acrylamide gel (acrylamide ความเข้มข้น 29 % และ methylene bisacrylamide 1%) 12 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 21 มิลลิลิตร จากนั้นเทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็มแล้วใส่หวีลงไปด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหวีออกและประกอบเข้ากับชุด sequencing gel เติมสารละลาย 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ในกระจก ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ทำ pre-run โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 1500 โวลต์ เป็นเวลา 20-30 นาที จากนั้นปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูด buffer มาล้างผิวหน้าของเจล หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-5 ไมโครลิตร ลงในช่องว่างแต่ละช่อง เปิดเครื่องโดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าเท่าเดิม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปิดเครื่อง แล้วดูด buffer จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย silver nitrate เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอต่อไป

การย้อมเจลด้วย silver nitrate ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Caetano-Anolles (1997) นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ในสารละลาย fixative (10% acetic acid) เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างสารละลาย fixative โดยใช้น้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่ และล้างต่อไปอีก 5 นาที เขย่าตลอดเวลา แล้วนำแผ่นเจลใส่ลงในสารละลาย silver nitrate ความเข้มข้น 0.2% ย้อมเจลนาน 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลออกมาจุ่มในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วเพื่อล้าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารละลาย silver nitrate ส่วนเกินออก ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer (sodium carbonate ความเข้มข้น 2.5% formaldehyde ความเข้มข้น 0.02% และ sodium thiosulfate 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนแล้ว ให้หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลใส่ใน stop solution (5% acetic acid และ 3% glycerol) เป็นเวลา 3-5 นาที แล้วนำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่น จากนั้นผึ่งให้แห้งในอากาศ

8.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำโดยเทคนิค ISSR มีขั้นตอนดังนี้

8.2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 50 ชนิด ตรวจสอบกับตัวอย่างสบู่ดำ 2 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ 5 ชนิด (ตารางที่ 8) ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และชัดเจน นำไพรเมอร์เหล่านี้ไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสบู่ดำทุกตัวอย่างต่อไป

ตารางที่ 8 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับเบส
Primer $(AC)_8G$	5' ACACACACACACACAC<u>G</u> 3'
Primer $(GA)_8C$	5' GAGAGAGAGAGAGAGA<u>C</u> 3'
Primer $(GA)_8T$	5' GAGAGAGAGAGAGAGA<u>T</u> 3'
Primer $(AG)_8T$	5' AGAGAGAGAGAGAGAG<u>T</u> 3'
Primer $(AG)_8YT$	5' AGAGAGAGAGAGAGAG<u>YT</u> 3'

หมายเหตุ Y = เบส C หรือ T

8.2.2 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้องค์ประกอบของสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 9 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1 รอบสำหรับการคลายเกลียวและแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 40 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 48-56 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.50 นาที ในรอบสุดท้ายเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ชนิดและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเทคนิค ISSR

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอ (50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	2.0
H_2O	15.3
dNTP mix (2 มิลลิโมลาร์)	1.5
10x PCR buffer	2.5
$MgCl_2$ (50 มิลลิโมลาร์)	1.0
ISSR primer (5 พิโคลโมล/ ไมโครลิตร)	1.0
Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.2
รวม	25

8.2.3 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ดูผลภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้

9. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม

9.1 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตร

9.1.1 การวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำโดยการนำข้อมูลที่บันทึก เช่น สีใบ สีผล รูปร่างผลของสบู่ดำแล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยของแต่ละ accession เปรียบเทียบข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอย่างทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) -PC เวอร์ชั่น 2.20k ซึ่งจะคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างสบู่ดำแต่ละตัวอย่างและสร้างแผนภูมิพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) ด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9.1.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางเกษตร วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ของแต่ละลักษณะโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT (International Rice Research Institute Statistics) และทำการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมรวมทั้งวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม NTSYS-PC เวอร์ชั่น 2.20k วิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principle Component Analysis: PCA) ซึ่งจะแสดงผลโดยการพล็อตกราฟสองมิติ โดยอาศัยข้อมูลระหว่างองค์ประกอบหลักที่ 1 และ 2

9.2 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นด้วยเครื่องหมาย AFLP และ ISSR บันทึกข้อมูลที่พบแถบดีเอ็นเอด้วย “1” และไม่พบแถบดีเอ็นเอด้วย “0” นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS -pc เวอร์ชั่น 2.20k ซึ่งจะคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างสบู่ดำแต่ละตัวอย่างและสร้างแผนภูมิพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA การคำนวณค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarlity) โดยใช้วิธี simple-matching (Sokal and Sneath, 1963) ดังสมการ

$$S_{ij} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

เมื่อ S_{ij}= ค่า similarity ระหว่างพันธุ์ i และพันธุ์ j

a = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้ง 2 พันธุ์

b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ i แต่ไม่พบในพันธุ์ j

c = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ j แต่ไม่พบในพันธุ์ i

d = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่เกิดขึ้นในพันธุ์ i และ j

คำนวณค่า Polymorphic Information Content (PIC) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง กรณีที่เครื่องหมายใดเครื่องหมายหนึ่งมีค่า PIC เท่ากับ 0.5 ก็จะหมายถึงครึ่งหนึ่งของเครื่องหมายนั้นปรากฏแถบดีเอ็นเอและอีกครึ่งหนึ่งไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งค่า PIC_S ที่ 0.5 เป็นค่าสูงสุดสำหรับเครื่องหมายที่เป็น dominance และเป็นเครื่องหมายที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphic band) มากที่สุด ค่า PIC_S สามารถคำนวณหาได้จากสูตรดังนี้

$$PIC = 1-\sum_{i=1}^{k} p_i^2$$

โดย p_i คือความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่ง p_i ประกอบด้วย p_a (absent allele) และp_p(present allele)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำและพืชชนิดใกล้เคียงด้วยเทคนิค AFLP

จากการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากคู่ไพรเมอร์ *Eco*RI primer +3 และ *Mse*I primer + 3 ทั้งหมด 82 คู่ พบว่ามีคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ 4 ตัวอย่าง จำนวน 10 คู่ นำไพรเมอร์ดังกล่าวไปใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างสบู่ดำ 128 accession และพืชใกล้เคียง 4 ชนิด รวมทั้งหมด 132 ตัวอย่าง

ผลจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างสบู่ดำและพืชชนิดใกล้เคียง พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 58-78 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เฉลี่ย 68 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 10) โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงที่สุดได้แก่คู่ไพรเมอร์ E-CAA/M-ATA ซึ่งให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 78 แถบ ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอต่ำที่สุดได้แก่คู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CAT ซึ่งให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 58 แถบ รวมแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดมีจำนวน 680 แถบ โดย 604 แถบเป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (polymorphic bands) ซึ่งคิดเป็น 88.82% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด คู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวน polymorphic band สูงที่สุด (98.28%) ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CAT ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวน polymorphic band ต่ำสุด (79.73%) ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ E-CAG/M-ATA

จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพืชทั้ง 5 ชนิด รวมทั้งสิ้น 129 แถบ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับสบู่ดำ 45 แถบ จำเพาะกับสบู่แดง (*J. gossypifolia*) 41 แถบ จำเพาะกับฝิ่นต้น (*J. multifida*) 24 แถบ จำเพาะกับหนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*) 9 แถบ และจำเพาะกับปัตตาเวีย (*J. integgerima*) 10 แถบ เมื่อพิจารณาเฉพาะตัวอย่างสบู่ดำ พบว่ามีจำนวน polymorphic band ทั้งหมดมี 58 แถบ คิดเป็น 8.53% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (ตารางที่ 10) คู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวน polymorphic bands สูงที่สุด (21 แถบ) ได้แก่คู่ไพรเมอร์ E-AGG/M-CTT นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่างสบู่ดำ J7 (จากสหรัฐอเมริกา) จำนวน 4 แถบ (จากคู่ไพรเมอร์ E-CAA/M-ATA จำนวน1 แถบ, E-AAG/M-CTA จำนวน 2 แถบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่าง และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ จากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำและพืชชนิดใกล้เคียง 4 ชนิดโดยใช้เทคนิค AFLP

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง	ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ
E[a]-AAC/M[b]-CAT	58	57	98.28	6
E-AAC/M-CTT	61	53	86.88	6
E-AAG/M-CAT	61	57	93.44	1
E-AAG/M-CTA	69	62	69.85	5
E-AGG/M-CAG	66	58	87.88	5
E-AGG/M-CAT	74	69	93.24	9
E-AGG/M-CTT	69	62	89.85	21
E-CAA/M-ATA	78	67	85.90	3
E-CAA/M-AAG	70	60	85.71	0
E-CAG/M-ATA	74	59	79.73	2
รวม	680	604	-	58
ค่าเฉลี่ย	68.0	60.4	88.82	5.8

[a] E = pre-amplification primer (GACTGCGTACCAATTC) of *Eco*RI

[b] M = pre-amplification primer (GATGAGTCCTGAGTAA) of *Mse*I.

และ E-AGG/M-CAG จำนวน 1 แถบ) และแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่างสบู่ดำ J41 (จาก จ. น่าน ประเทศไทย) จำนวน 1 แถบ (จากคู่ไพรเมอร์ E-CAG/M-ATA)

เมื่อคำนวณค่า PICs ของ polymorphic bands ทั้งหมด 604 แถบ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.014-0.109 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.031

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำและพืชชนิดใกล้เคียงด้วยเทคนิค ISSR

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำและพืชชนิดใกล้เคียงด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 6-13 แถบต่อไพรเมอร์ เฉลี่ย 10 แถบต่อไพรเมอร์ (ตารางที่ 11)ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงที่สุด (13 แถบ) ได้แก่ไพรเมอร์ $(GA)_8C$ ส่วนไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอต่ำที่สุด (6 แถบ) ได้แก่ไพรเมอร์ $(AG)_8YT$ รวมแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจำนวน 50 แถบ โดยเป็น polymorphic bands จำนวน 43 แถบ หรือคิดเป็น 86.0% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด ไพรเมอร์ที่ให้จำนวน polymorphic band สูงสุด (100%) ได้แก่ไพรเมอร์ $(AG)_8YT$ ส่วนไพรเมอร์ที่ให้จำนวน polymorphic band ต่ำสุด (75%) ได้แก่ไพรเมอร์ $(AG)_8T$

จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค ISSR พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับสบู่แดง 9 แถบ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่างพืชใกล้เคียงอื่น ๆ อีก 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 11 จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างสบู่ดำและพืชใกล้เคียง 4 ชนิด และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ จากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำและพืชชนิดใกล้เคียง 4 ชนิดโดยใช้เทคนิค ISSR

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง	เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ
$(AC)_8G$	9	8	88.89	6
$(AG)_8T$	12	9	75.00	6
$(AG)_8YT$	6	6	100.00	5
$(GA)_8C$	13	12	92.31	3
$(GA)_8T$	10	8	80.00	9
รวม	50	43	-	29
เฉลี่ย	10.0	8.6	86.00	5.8

หมายเหตุ Y = เบส C หรือ T

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณาเฉพาะตัวอย่างสบู่ดำพบว่ามี จำนวน polymorphic bands ทั้งหมด 29 แถบ คิดเป็น 58.0% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (ตารางที่ 11) ไพรเมอร์ที่ให้จำนวน polymorphic bands สูงที่สุด(9 แถบ)ได้แก่ ไพรเมอร์ $(AG)_8T$ นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่างสบู่ดำ J7 (จากสหรัฐอเมริกา) จำนวน 4 แถบซึ่งมาจากไพรเมอร์ $(AG)_8T$ 1 แถบ และ $(GA)_8T$ 3 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่างสบู่ดำ J8 (จาก จ. แพร่ ประเทศไทย) จำนวน 1 แถบ ซึ่งมาจากไพรเมอร์ $(AG)_8T$

เมื่อคำนวณค่า PICs ของ polymorphic bands ทั้งหมด 604 แถบ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.014-0.205 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.024

ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำและพืชชนิดใกล้เคียง

เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP และ ISSR มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธีของ Sokal and Sneath (1963) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.249 (ระหว่างตัวอย่างสบู่แดงและหนุมานนั่งแท่น) ถึง 1.00 (ระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ) (ตารางที่ 12) แสดงให้เห็นว่าสบู่แดง และหนุมานนั่งแท่น มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด ในขณะที่สบู่ดำทั้ง 128 accession มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด

ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างสบู่ดำที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.842 (ระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ J7 จากสหรัฐฯ และตัวอย่าง J105 จาก จ.น่าน ประเทศไทย) และสูงสุดเท่ากับ 1.00 (ระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ J7 จากสหรัฐ และตัวอย่างสบู่ดำ J2 จาก จ.พิษณุโลก) แสดงให้เห็นว่าในระหว่างตัวอย่างสบู่ดำด้วยกันนั้น สบู่ดำ J7 กับ J105 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด ส่วนสบู่ดำ J7 และ J12 ไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างสบู่ดำมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.995 แสดงว่าตัวอย่างสบู่ดำทั้ง 128 accession มีความคล้ายคลึงกันมากหรือแตกต่างกันน้อยมาก

จากตารางที่ 12 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างสบู่ดำมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสบู่แดงมากที่สุด รองลงมาคือ ฝิ่นต้น หนุมานนั่งแท่นและปัตตาเวียตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำกับพืชใกล้เคียง 4 ชนิด

พืชในสกุล *Jatropha*	สบู่ดำ (*J. curcas*)	สบู่แดง *(J. gossypifolia)*	ปัตตาเวีย (*J.integgerima*)	หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*)	ฝิ่นต้น (*J. multifida*)
สบู่ดำ	0.84-1.00 (Avg= 0.99)	0.28-0.31	0.39-0.45	0.29-0.35	0.27-0.34
สบู่แดง	0.28-0.31 (Avg= 0.31)	1.0	0.26	0.25	0.26
ปัตตาเวีย	0.39-0.45 (Avg= 0.41)	0.26	1.00	0.31	0.32
หนุมานนั่งแท่น	0.29-0.35 (Avg= 0.35)	0.25	0.31	1.00	0.48
ฝิ่นต้น	0.27-0.34 (Avg= 0.34)	0.26	0.32	0.48	1.00

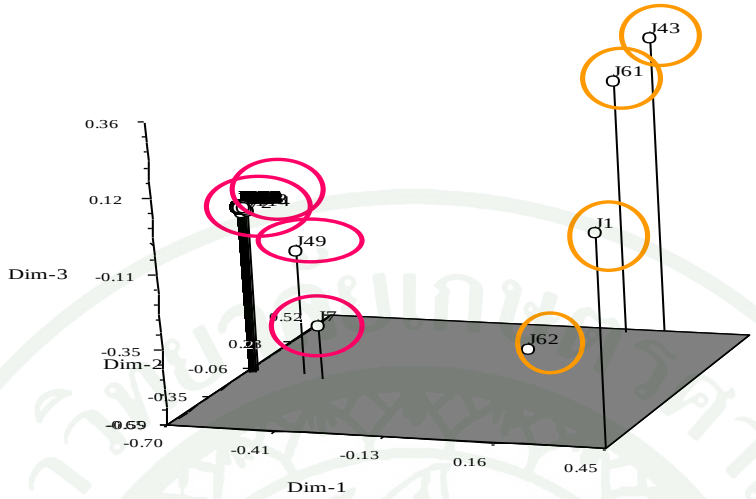
การวิเคราะห์การจัดกลุ่มสบู่ดำ

เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเฉพาะตัวอย่างสบู่ดำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่มและสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำอยู่ในช่วง 0.85-1.00 ทำให้สามารถแบ่งสบู่ดำออกจากพืชใกล้เคียง 4 ชนิดได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 2) และสบู่ดำสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 3) โดยตัวอย่างสบู่ดำเกือบทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ส่วนตัวอย่างสบู่ดำ J7 จากสหรัฐอเมริกาที่มีพันธุกรรมแตกต่างจากสบู่ดำตัวอย่างอื่น ๆ จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 จากการจัดกลุ่มแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างสบู่ดำส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม ยกเว้นสบู่ดำ J7 ที่มีพันธุกรรมแตกต่างจนแยกออกมาเป็นอีกกลุ่มหนึ่ง (ภาพที่ 3)

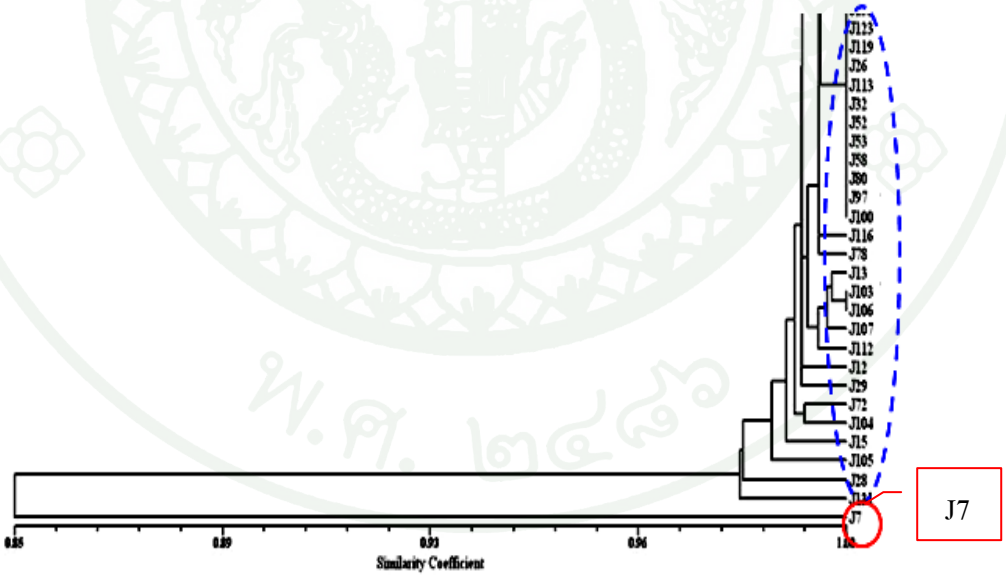
การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสบู่ดำจำนวน 8 ลักษณะ ได้แก่ สีใบ รูปร่างใบ ลักษณะรอยหยักใบ รูปทรงช่อดอก รูปร่างผล สีผล รูปร่างเมล็ด และสีเปลือกหุ้มเมล็ด แล้วนำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ (วงกลมสีชมพู) และพืชชนิดใกล้เคียง 4 ชนิด (วงกลมสีน้ำตาล) ด้วยวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) โดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP และ ISSR



ภาพที่ 3 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP และ ISSR ซึ่งแบ่งตัวอย่างสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (วงกลมสีน้ำเงิน) และกลุ่มที่ 2 (วงกลมสีแดง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำทั้ง 128 accession พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.75-1.00 ซึ่งจัดว่ามีค่าสูงมาก หรือสบู่ดำมีความหลากหลายต่ำมากในลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำส่วนใหญ่ จำนวน 127 accession สบู่ดำในกลุ่มนี้มีใบสีเขียว ลักษณะเป็นรูปโล่ มีรอยหยักใบ 5 หยัก ดอกออกเป็นช่อแบบ compound dichasia ลักษณะของดอกในช่อดอกเป็นรูปถ้วย ผลมีสีเขียว รูปทรงของผลค่อนข้างกลม เมล็ดมีลักษณะแบนรี และมีสีเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีดำ ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสบู่ดำเพียง accession เดียวคือ J23 ซึ่งมีลักษณะใบและผลด่าง (สีเขียวสลับขาว) ส่วนลักษณะอื่น ๆ ไม่แตกต่างจากสบู่ดำในกลุ่มที่ 1

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางเกษตร

จากการศึกษาลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำจำนวน 23 ลักษณะ และวิเคราะห์ค่าทางสถิติต่าง ๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน(C.V.) (ตารางที่ 13) พบว่าลักษณะที่มีความแปรปรวนมากที่สุดสามอันดับแรก ได้แก่ อัตราส่วนของดอกตัวเมียต่อดอกตัวผู้ (C.V. 35.29%) น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (C.V. 34.60%) และจำนวนดอกตัวเมียต่อช่อ (C.V. 32.55%) แสดงว่าลักษณะทั้งสามดังกล่าวมีความหลากหลายสูง ส่วนลักษณะที่มีความแปรปรวนต่ำที่สุดสามอันดับแรก ได้แก่ จำนวนพูต่อผล (C.V. 1.36%) ความกว้างเมล็ด (C.V. 2.73%) และความหนาของเมล็ด (C.V. 3.60%)

เมื่อพิจารณาลักษณะทางเกษตรที่เป็นองค์ประกอบของผลผลิต พบว่าสบู่ดำ J117 เป็น accession ที่มีลักษณะโดดเด่นที่สุด เนื่องจากมีจำนวนเมล็ดต่อต้นสูงที่สุด (75.38 เมล็ด/ต้น) น้ำหนักเมล็ดต่อต้นมากที่สุด (40.26 กิโลกรัมต่อไร่) และมีจำนวนพูต่อผลมากที่สุด บางผลมี 4 พู ในขณะที่สบู่ดำส่วนใหญ่มี 3 พู นอกจากนี้ยังมีจำนวนช่อดอกต่อต้นเฉลี่ยค่อนข้างสูง (4.34 ช่อ/ต้น) เมื่อเปรียบเทียบกับสบู่ดำทั้งหมดที่มีจำนวนช่อดอกอยู่ระหว่าง 1.22-5.22 ช่อ/ต้น

การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะทางเกษตร

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะทางเกษตร 23 ลักษณะของสบู่ดำ 128 accession พบว่าลักษณะส่วนใหญ่มีสหสัมพันธ์กันในทางบวก (ตารางที่ 14) ยกเว้นลักษณะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำ 128 accession

ลักษณะทางเกษตร	ค่าต่ำสุด-สูงสุด	ค่าเฉลี่ย (mean)	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (C.V.)(%)	F-test
ความสูงต้น (ซม.)	86.67-246.11	175.26	23.69	13.52	**
ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	61.67-131.11	97.41	13.12	13.47	**
จำนวนกิ่งแรก	1.67-5.11	2.37	0.53	22.26	**
จำนวนกิ่งรอง	2.33-7.50	4.05	0.94	23.44	**
ความยาวใบ (ซม.)	9.54-17.75	13.58	1.00	7.37	**
ความกว้างใบ (ซม.)	7.90-16.23	12.89	1.29	9.98	**
ความยาวก้านใบ (ซม.)	10.08-22.93	14.97	1.75	11.69	**
อายุวันออกดอก (วัน)[1]	148.33-383.72	283.28	25.56	9.02	*
จำนวนดอกตัวผู้/ช่อ	22.17-108.81	74.73	14.83	19.85	*
จำนวนดอกตัวเมีย/ช่อ	1.10-5.35	3.10	1.01	32.55	**
อัตราส่วนดอกตัวเมีย/ดอกตัวผู้	1:14-1:91	1:30	10.44	35.29	*
จำนวนช่อดอก/ต้น	1.22-5.22	3.47	0.74	21.25	**
จำนวนช่อผล/ต้น	1.08-6.18	2.91	0.88	30.22	**
จำนวนผล/ต้น	3.17-29.54	14.88	4.71	31.69	**
จำนวนพู/ผล	2.78-3.11	3.00	0.04	1.36	**
ความยาวผล (มม.)	13.94-32.10	25.19	2.73	10.84	**
ความกว้างผล (มม.)	17.07-32.11	22.29	2.74	12.31	**
ความยาวเมล็ด (มม.)	14.40-22.90	16.91	1.00	5.93	**
ความกว้างเมล็ด (มม.)	9.10-10.61	10.06	0.27	2.73	**
ความหนาเมล็ด (มม.)	6.87-8.54	7.68	0.28	3.60	**
น้ำหนัก 100 เมล็ด(ก.)	2.81-64.6	49.9	0.72	14.51	**
จำนวนเมล็ด/ต้น[2]	5.40-75.38	38.51	12.04	31.27	**
ผลผลิตเมล็ด[2] (กก./ไร่)	1.83-40.26	19.43	6.72	34.60	*

[1] นับจากวันย้ายปลูกจนถึงวันออกดอกของช่อดอกที่ 12

[2] นับตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม 2551

*, ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อายุวันออกดอกที่มีสหสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญและสำคัญยิ่งทางสถิติกับลักษณะอื่น ๆ 11 ลักษณะ เมื่อพิจารณาลักษณะทางเกษตรที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิตของสบู่ดำ ได้แก่ จำนวนเมล็ดต่อต้น และผลผลิตเมล็ดต่อไร่ พบว่าจำนวนเมล็ดต่อต้นมีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญและสำคัญยิ่งทางสถิติกับทุกลักษณะ ยกเว้นอายุวันออกดอกมีความสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (-0.256) นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนเมล็ดต่อต้นมีความสัมพันธ์ทางบวกสูงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับจำนวนผลต่อต้น และจำนวนช่อผลต่อต้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.956 และ 0.680 ตามลำดับ ส่วนผลผลิตเมล็ดต่อไร่มีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญและสำคัญยิ่งทางสถิติกับทุกลักษณะ ยกเว้นอายุวันออกดอกมีความสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (-0.229) ทั้งนี้ผลผลิตเมล็ดต่อไร่มีความสัมพันธ์ทางบวกสูงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับจำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนผลต่อต้น และจำนวนช่อผลต่อต้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.936, 0.895 และ 0.665 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะผลผลิตเมล็ดกับลักษณะทางเกษตรอื่น ๆ ดังกล่าว ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือก accession สบู่ดำที่มีแนวโน้มจะให้ผลผลิตเมล็ดสูงโดยการพิจารณาจากลักษณะที่มีสหสัมพันธ์ในทางบวกกับผลผลิตเมล็ดต่อไร่ เช่น จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนช่อผลต่อต้น และจำนวนผลต่อต้น

การวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางเกษตร

จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางเกษตรและวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยอาศัยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักหรือ PCA และแสดงผลโดยการพล็อตกราฟสองมิติโดยอาศัยข้อมูลขององค์ประกอบหลักที่ 1 และ 2 พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายในลักษณะทางเกษตรเนื่องจากการกระจายตัวของสบู่ดำทั้ง 128 accession (ภาพที่ 4) และมีค่าองค์ประกอบหลักที่ 1 และ 2 ครอบคลุม 61.73 และ 10.13% หรือรวมเป็น 71.86% ของความแปรปรวนทั้งหมด

ถึงแม้ว่ากราฟสองมิติที่เป็นผลจากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักจะไม่สามารถแบ่งกลุ่มสบู่ดำได้อย่างชัดเจน แต่จากกราฟพบว่ามีสบู่ดำบาง accession ที่แยกจาก accession อื่น ๆ อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4) accession ที่แยกออกมาเหล่านี้มีลักษณะทางเกษตรที่เฉพาะตัวบางประการ เช่น สบู่ดำ J54 ที่แยกออกมาอย่างชัดเจนนั้นมีลักษณะเฉพาะคือออกดอกเร็วกว่า accession อื่น ๆ โดยมีอายุออกดอก 143.88 วัน ในขณะที่ค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของสบู่ดำเป็น 283.28 วัน สบู่ดำ J23 ที่แยกออกมาอย่างชัดเจนมีลักษณะเฉพาะหลายอย่าง ได้แก่ มีความสูงต้นและความกว้างทรงพุ่มน้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางเกษตร 23 ลักษณะของสบู่ดำ 128 accession

ลักษณะ	ความสูงต้น	ความกว้างทรงพุ่ม	จำนวนกิ่ง		ใบ	
			แรก	รอง	ความยาว	ความกว้าง
ความสูงต้น	-	0.658**	0.149**	0.449**	0.255**	0.290**
ความกว้างทรงพุ่ม		-	0.181**	0.370**	0.179**	0.173**
จำนวนกิ่งแรก			-	0.759**	0.089	0.056
จำนวนกิ่งรอง				-	0.171**	0.198**
ความยาวใบ					-	0.524**
ความกว้างใบ						-
ความยาวก้านใบ						
อายุวันออกดอก[1]						
จำนวนดอกตัวผู้/ช่อ						
จำนวนดอกตัวเมีย/ช่อ						
อัตราส่วนดอกตัวเมีย/ดอกตัวผู้						
จำนวนช่อดอก/ต้น						
จำนวนช่อผล/ต้น						
จำนวนผล/ต้น						
จำนวนพู/ผล						
ความยาวผล						
ความกว้างผล						
ความยาวเมล็ด						
ความกว้างเมล็ด						
ความหนาเมล็ด						
น้ำหนัก 100 เมล็ด						
จำนวนเมล็ด/ต้น[2]						
ผลผลิตเมล็ด [2]						

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลักษณะ	ความยาวก้านใบ	อายุวันออกดอก[1]	จำนวนดอก		อัตราส่วนดอกตัวเมีย/ดอกตัวผู้
			ตัวผู้/ช่อ	ตัวเมีย/ช่อ	
ความสูงต้น	0.368**	-0.296**	0.112*	0.114*	-0.048
ความกว้างทรงพุ่ม	0.285**	-0.148**	-0.071	0.029	-0.087
จำนวนกิ่งแรก	0.231**	0.017	-0.057	-0.095	0.031
จำนวนกิ่งรอง	0.354**	-0.214**	-0.045	-0.023	0.004
ความยาวใบ	0.523**	-0.047	-0.033	-0.032	0.009
ความกว้างใบ	0.453**	-0.089	0.077	0.028	0.025
ความยาวก้านใบ	-	-0.026	-0.066	-0.018	-0.006
อายุวันออกดอก[1]		-	-0.102	-0.063	-0.017
จำนวนดอกตัวผู้/ช่อ			-	0.546**	0.061
จำนวนดอกตัวเมีย/ช่อ				-	-0.589**
อัตราส่วนดอกตัวเมีย/ดอกตัวผู้					-
จำนวนช่อดอก/ต้น					
จำนวนช่อผล/ต้น					
จำนวนผล/ต้น					
จำนวนพู/ผล					
ความยาวผล					
ความกว้างผล					
ความยาวเมล็ด					
ความกว้างเมล็ด					
ความหนาเมล็ด					
น้ำหนัก 100 เมล็ด					
จำนวนเมล็ด/ต้น[2]					
ผลผลิตเมล็ด[2]					

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลักษณะ	จำนวนช่อดอก/ต้น	จำนวนช่อผล/ต้น	จำนวนผล/ต้น	จำนวนพู/ผล	ผล	
					ความยาวผล	ความกว้างผล
ความสูงต้น	0.043	0.237**	0.304**	0.067	-0.038	-0.049
ความกว้างทรงพุ่ม	-0.032	0.249**	0.178**	0.027	0.101*	0.016
จำนวนกิ่งแรก	-0.094	0.012	-0.048	-0.127*	0.060	0.067
จำนวนกิ่งรอง	-0.076	0.167**	0.181**	-0.010	0.007	0.024
ความยาวใบ	0.036	0.058	0.060	-0.027	0.005	0.001
ความกว้างใบ	-0.047	0.056	0.140**	0.009	-0.014	-0.009
ความยาวก้านใบ	-0.060	0.045	0.102*	0.008	0.013	-0.007
อายุวันออกดอก[1]	-0.061	-0.220**	-0.255**	-0.108*	0.059	0.026
จำนวนดอกตัวผู้/ช่อ	0.479**	0.063	0.211**	-0.002	-0.056	-0.058
จำนวนดอกตัวเมีย/ช่อ	0.340**	0.080	0.212**	0.015	0.008	-0.046
อัตราส่วนดอกตัวเมีย/ดอกตัวผู้	0.009	0.012	-0.025	0.003	-0.114*	-0.046
จำนวนช่อดอก/ต้น	-	0.151**	0.193**	0.044	-0.078	-0.070
จำนวนช่อผล/ต้น		-	0.718**	0.095	-0.032	0.007
จำนวนผล/ต้น			-	0.144**	-0.059	-0.049
จำนวนพู/ผล				-	-0.027	-0.021
ความยาวผล					-	0.879**
ความกว้างผล						-
ความยาวเมล็ด						
ความกว้างเมล็ด						
ความหนาเมล็ด						
น้ำหนัก 100 เมล็ด						
จำนวนเมล็ด/ต้น[2]						
ผลผลิตเมล็ด[2]						

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลักษณะ	เมล็ด			น้ำหนัก 100 เมล็ด	จำนวนเมล็ด/ต้น[2]	ผลผลิตเมล็ด[2]
	ความยาว	ความกว้าง	ความหนา			
ความสูงต้น	0.196**	0.218**	0.210**	-0.043	0.337*	0.268**
ความกว้างทรงพุ่ม	0.198**	0.199**	0.218**	-0.077	0.186**	0.138**
จำนวนกิ่งแรก	0.032	-0.037	0.045	-0.051	-0.029	-0.035
จำนวนกิ่งรอง	0.100	0.094	0.233**	-0.071	0.200**	0.163**
ความยาวใบ	0.085	0.089	0.136**	-0.003	0.070	0.053
ความกว้างใบ	0.018	0.079	0.133**	0.076	0.162**	0.152**
ความยาวก้านใบ	0.075	0.069	0.154**	-0.013	0.132**	0.127*
อายุวันออกดอก[1]	-0.138**	-0.246**	-0.277**	0.009	-0.256**	-0.229**
จำนวนดอกตัวผู้/ช่อ	-0.092	0.063	0.006	0.061	0.233**	0.217**
จำนวนดอกตัวเมีย/ช่อ	-0.120*	0.083	0.012	0.039	0.196**	0.180**
อัตราส่วนดอกตัวเมีย/ดอกตัวผู้	0.023	-0.015	-0.019	0.007	-0.016	-0.014
จำนวนช่อดอก/ต้น	-0.002	0.057	0.059	0.036	0.198**	0.186**
จำนวนช่อผล/ต้น	0.135**	0.215**	0.263**	0.178*	0.680**	0.665**
จำนวนผล/ต้น	0.066	0.219**	0.187**	0.109*	0.956**	0.895**
จำนวนพู/ผล	0.006	0.000	-0.011	0.078	0.150**	0.151**
ความยาวผล	0.012	0.006	0.012	0.011	-0.055	-0.055
ความกว้างผล	0.030	0.021	0.007	0.056	-0.049	-0.035
ความยาวเมล็ด	-	0.303**	0.311**	-0.049	0.061	0.041
ความกว้างเมล็ด		-	0.408**	0.106*	0.207**	0.206**
ความหนาเมล็ด			-	0.058	0.169**	0.162**
น้ำหนัก 100 เมล็ด				-	0.115*	0.415**
จำนวนเมล็ด/ต้น[2]					-	0.936**
ผลผลิตเมล็ด[2]						-

[1] นับจากวันย้ายปลูกจนถึงวันออกดอกของช่อดอกที่ 12

[2] นับตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม 2551

*, ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

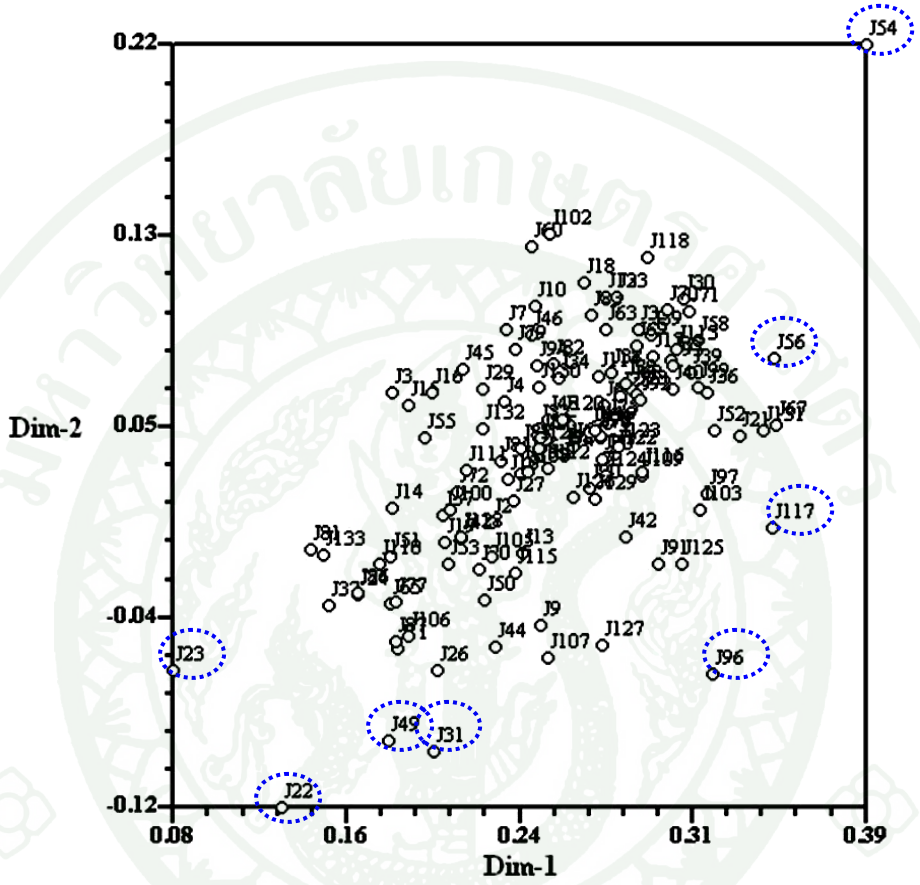
ที่สุด ความยาวใบและความยาวก้านใบน้อยที่สุด จำนวนช่อผลต่อต้นและจำนวนผลต่อต้นน้อยที่สุด สบู่ดำ J31 และ J49 มีลักษณะเฉพาะเช่น ต้นเตี้ย จำนวนช่อดอกต่อต้นค่อนข้างสูง ความกว้างผลค่อนข้างน้อย เมล็ดค่อนข้างยาว และมีอายุวันออกดอกมากกว่า 320 วัน สบู่ดำ J96 มีลักษณะเฉพาะเช่น ต้นเตี้ย จำนวนช่อผลต่อต้นและจำนวนผลต่อต้นมากที่สุด จำนวนช่อดอกต่อต้นและน้ำหนักเมล็ดต่อต้นค่อนข้างสูง และเมล็ดค่อนข้างยาวกว่า accession อื่น ๆ ส่วนสบู่ดำ J117 ที่มีลักษณะทางเกษตรซึ่งเป็นองค์ประกอบของผลผลิตที่โดดเด่นดังที่ได้กล่าวไว้แล้วนั้นก็แยกตัวออกจาก accession อื่น ๆ แต่ไม่เด่นชัดเท่ากับ J54 J23 J22 J31 J49 และ J96 ที่ได้กล่าวไว้ในตอนต้น

การเปรียบเทียบผลการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตร

เมื่อเปรียบเทียบผลการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตร พบว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นลักษณะทางคุณภาพสามารถแบ่งตัวอย่างสบู่ดำออกเป็นกลุ่มได้ชัดเจนกว่าการใช้ลักษณะทางเกษตรซึ่งเป็นลักษณะทางปริมาณ แต่เมื่อพิจารณาถึงระดับของความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุสูงกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามาก จากผลการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่ากลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำจำนวนมากถึง 127 accession ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ แต่จากกราฟผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักโดยอาศัยข้อมูลลักษณะทางเกษตร (ภาพที่ 4) พบว่าสบู่ดำในกลุ่มดังกล่าวมีการกระจายตัวแยกออกจากกันเนื่องจากมีลักษณะทางเกษตรที่แตกต่างกัน การจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรอาจให้ผลที่สอดคล้องหรือไม่สอดคล้องกันก็ได้ เช่น ผลจากการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำ J23 มีความสอดคล้องกัน เนื่องจากสบู่ดำ accession นี้มีความแตกต่างจาก accession อื่น ๆ อย่างชัดเจนทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตร จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าสบู่ดำ J23 มีสีใบและสีผลต่างจาก accession อื่น ๆ ส่วนลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำ accession นี้มีลักษณะที่เฉพาะหลายอย่าง ได้แก่ จำนวนช่อผล จำนวนผลต่อต้น และน้ำหนักเมล็ดต่อต้นน้อยที่สุด ส่วนความกว้างใบและความยาวก้านใบค่อนข้างน้อยกว่า accession อื่น แต่ผลการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำ accession อื่น ๆ อาจไม่สอดคล้องกันเนื่องจากบาง accession มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่แตกต่างจาก accession

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อื่น แต่อาจมีลักษณะทางเกษตรที่เป็นเอกลักษณ์ เช่น ผลการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสบู่ดำ J54 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ร่วมกับสบู่ดำอีก 127 accession เนื่องจากสบู่ดำ J54 มี



ภาพที่ 4 กราฟสองมิติแสดงการกระจายตัวของสบู่ดำ 128 accession จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) โดยอาศัยข้อมูลลักษณะทางเกษตร 23 ลักษณะ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างจาก accession อื่น ๆ แต่มีลักษณะทางเกษตรคือ อายุวันออกดอกที่แตกต่างจาก accession อื่น ๆ อย่างชัดเจน สบู่ดำอีก accession หนึ่งคือ J117 ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 เช่นเดียวกันเมื่อจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ถ้าพิจารณาจากลักษณะทางเกษตร พบว่า accession นี้มีลักษณะทางเกษตรซึ่งเป็นองค์ประกอบของผลผลิตที่ดีเด่นกว่า accession อื่นอย่างเห็นได้ชัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

จากการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำด้วยเทคนิค AFLP และ ISSR พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ๆ ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลของงานวิจัยหลายเรื่องที่ได้รายงานผลการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศต่าง ๆ เช่น ผลการทดลองของ Pamidimarri *et al.* (2010) ที่ได้ทำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศอินเดีย 28 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค AFLP และ RAPD พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของสบู่ดำมีค่าสูง คืออยู่ในช่วง 0.866-1.00 ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของสบู่ดำอยู่ในช่วง 0.8428-1.00 เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยใช้เทคนิค AFLP ในการทดลองนี้กับการทดลองของ Pamidimarri *et al.* (2010) ซึ่งมีคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองเหมือนกัน 3 คู่ พบว่าเชื้อพันธุกรรมในการทดลองครั้งนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่าเชื้อพันธุกรรมสบู่ดำในอินเดีย เนื่องจากในการทดลองนี้พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำน้อยกว่า และจากงานวิจัยของ Shen *et al.* (2010) ซึ่งได้ใช้เทคนิค AFLP ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในมณฑลไห่หนาน ประเทศจีน พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำเช่นเดียวกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของสบู่ดำอยู่ในช่วง 0.866-0.977 นอกจากนี้ Tanya *et al.* (2010) ได้ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจากประเทศเม็กซิโก จีน ไทย และเวียดนาม รวม 30 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค ISSR ก็พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำเช่นเดียวกัน แต่จากรายงานการทดลองเพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างสบู่ดำใน Andhra Pradesh ประเทศอินเดียโดยใช้เทคนิค AFLP พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างสบู่ดำออกเป็นกลุ่มได้ดี และพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่างหรือแถบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างมีความถี่ในการพบต่ำ (rare band) เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างสบู่ดำใน Andhra Pradesh มีปริมาณน้ำมันที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tatikonda *et al.*, 2009) แต่จากรายงานดังกล่าวก็ไม่อาจให้ข้อสรุปได้ว่าสบู่ดำใน Andhra Pradesh มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าสบู่ดำจากแหล่งอื่น ๆ ที่ได้กล่าวถึงข้างต้น เนื่องจากเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบและคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การที่สบู่ดำในประเทศไทยและในแถบเอเชียมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ๆ นั้นอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากสบู่ดำเป็นพืชนำเข้าจากต่างประเทศ เชื่อกันว่าพืชชนิดนี้เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศในแถบอเมริกากลาง และถูกพ่อค้าชาวโปรตุเกสนำเข้ามาในประเทศไทยเมื่อประมาณสองร้อยกว่าปีก่อน (Ratree, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสบู่ดำในประเทศอินเดียและจีนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำเช่นเดียวกับสบู่ดำในประเทศไทย ซึ่งในรายงานต่าง ๆ ให้เหตุผลว่าจำนวนพันธุ์สบู่ดำที่นำเข้ามาในประเทศแถบเอเชียนั้น ในเบื้องต้นอาจมีจำนวนไม่มากนัก นอกจากนี้สบู่ดำยังสามารถขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการปักชำกิ่งได้ ทำให้ต้นที่ได้มีลักษณะและพันธุกรรมเหมือนต้นเดิม ซึ่งอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ (Basha and Sujatha, 2007; Pamidimarri *et al.*, 2009) ยิ่งกว่านั้นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สบู่ดำที่พบในประเทศแถบเอเชียมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำคือระยะเวลาที่พืชชนิดนี้ได้ถูกนำเข้ามาปลูก ระยะเวลาเพียงสองร้อยปีนั้นถือว่าไม่ยาวนานพอที่จะทำให้พืชชนิดนี้มีการวิวัฒนาการหรือสะสมการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม (Zhang *et al.*, 2011)

จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อพันธุกรรมสบู่ดำที่ใช้ในการทดลองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ จากแผนภูมิทางพันธุกรรมพบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ โดยตัวอย่างสบู่ดำเกือบทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 มีเพียงสบู่ดำ J7 จากสหรัฐอเมริกาที่มีพันธุกรรมแตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ ค่อนข้างชัดเจนจึงถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 2 จากการสังเกตจะพบว่าสบู่ดำจากต่างประเทศบางตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างจากประเทศจีน อินเดีย ศรีลังกา ลาว และสุริเนม มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกับตัวอย่างสบู่ดำบางตัวอย่างในประเทศไทยจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้

ความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืชขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรม ถ้าเชื้อพันธุกรรมมีความหลากหลายสูง โอกาสที่การปรับปรุงพันธุ์จะประสบความสำเร็จก็มีสูง ผลการประเมินความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมสบู่ดำในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าควรมีการนำเข้าเชื้อพันธุกรรมจากต่างประเทศเพื่อเพิ่มระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยควรนำเข้าเชื้อพันธุกรรมจากประเทศที่เป็นต้นกำเนิดของสบู่ดำ ได้แก่ประเทศในทวีปอเมริกาใต้ โดยเฉพาะประเทศเม็กซิโก และประเทศในแถบอเมริกากลาง ซึ่งจากการวิจัยของ Basha *et al.* (2009) รายงานว่าสบู่ดำในประเทศเม็กซิโกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าสบู่ดำในประเทศอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อพันธุกรรมสบู่ดำพันธุ์ปลูกในประเทศบราซิลมีความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าสบู่ดำที่มาจากประเทศอื่น ๆ ในแถบแอฟริกา เอเชีย และอเมริกากลาง (Grativol *et al*., 2010) ประเทศไทยควรมีการนำเข้าเชื้อพันธุกรรมสบู่ดำจากแหล่งที่มีรายงานว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงดังกล่าว

อีกหนทางหนึ่งที่จะสามารถเพิ่มระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำได้คือการนำสบู่ดำไปเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยใช้สารเคมีหรือรังสีในการก่อกลายพันธุ์ มีรายงานการใช้วิธีเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์เพื่อเพิ่มฐานพันธุกรรมของสบู่ดำที่มีจำกัดให้มีความหลากหลายมากขึ้นอย่างได้ผลในประเทศอินเดีย โดยพบว่าสบู่ดำที่กลายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างหลากหลายมากขึ้น และสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกสบู่ดำที่กลายพันธุ์เหล่านี้ได้ (Punia, 2007)

จากการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสบู่ดำกับพืชชนิดใกล้เคียงอีก 4 ชนิด ได้แก่สบู่แดง ปัตตาเวีย หนุมานนั่งแท่น และฝิ่นต้น พบว่าปัตตาเวียมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับสบู่ดำมากที่สุด รองลงมาได้แก่ หนุมานนั่งแท่น ฝิ่นต้น และสบู่แดง ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สามารถอธิบายความสำเร็จในการทดลองผสมข้ามชนิดระหว่างสบู่ดำกับปัตตาเวียได้ การที่พืชสองชนิดนี้มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้สามารถผสมข้ามชนิดกันได้ จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสบู่ดำและปัตตาเวียสามารถผสมข้ามชนิดได้ (Rupert *et al*., 1970; Dehgan, 1984;) และสามารถผสมสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) ได้ (Suiatha and Prabakaran, 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าลูกผสมชั่วที่ 1 (F1) เมื่อนำไปผสมกลับ (backcross) ไปยังสบู่ดำ พบว่าลูกผสมกลับที่ได้มีการแสดงลักษณะของผลและเมล็ดที่ดีเด่นกว่าพ่อแม่ เนื่องจากเกิด transgressive segregation (Suiatha and Prabakaran, 2003) ดังนั้นการผสมข้ามชนิดระหว่างสบู่ดำกับพืชที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงอาจเป็นหนทางหนึ่งในการเพิ่มระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำและอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ และจากการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชต่างชนิดสามารถนำมาใช้ในการคาดคะเนความสำเร็จในการผสมข้ามชนิดได้ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพืชทั้ง 5 ชนิดที่พบในการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่างพืชต่างชนิดเหล่านี้ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตร

ผลการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนมีเพียงลักษณะใบและผลด่างที่มีสีเขียวสลับขาวซึ่งพบในสบู่ดำเพียง accession เดียวเท่านั้น คือ J23 และจากการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กุล่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยสบู่ดำ 127 accession ส่วนกลุ่มที่สองประกอบด้วยสบู่ดำเพียง accession เดียว ซึ่งสอดคล้องกับ พีระศักดิ์ (2555) ที่กล่าวว่าเชื้อพันธุกรรมของสบู่ดำที่พบโดยทั่วไปมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และยังมีคุณสมบัติของพันธุ์ป่าอยู่มาก

ผลการศึกษาความแปรปรวนในลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำจำนวน 23 ลักษณะ พบว่าลักษณะที่มีความแปรปรวนสูงที่สุดสามอันดับแรกได้แก่ อัตราส่วนของดอกตัวเมียต่อดอกตัวผู้ (C.V. 35.29%) น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (C.V. 34.60%) และจำนวนดอกตัวเมียต่อช่อ (C.V. 32.55%) โดยเฉพาะอย่างยิ่งอัตราส่วนของดอกตัวเมียต่อดอกตัวผู้เป็นลักษณะที่มีความแปรปรวนสูงมากโดยผันแปรอยู่ระหว่าง 1:14 ถึง 1:91 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Prakash *et al*. (2007) ที่รายงานว่าอัตราส่วนของดอกตัวเมียต่อดอกตัวผู้มีความแปรปรวนสูง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1:20 แต่ในสภาพอากาศที่เย็น พบว่าอัตราส่วนของดอกเมียต่อดอกตัวผู้ของต้นสบู่ดำมีการเปลี่ยนแปลงและแปรปรวนเป็นอย่างมาก บางต้นอาจพบว่าอัตราส่วนของดอกตัวเมียต่อตัวผู้มีค่าเท่ากับ 1:108 แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำบางลักษณะอาจได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงควรทำการทดลองเพื่อหาค่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม (genetic heritability) และการตอบสนองต่อการคัดเลือกของลักษณะต่าง ๆ เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำต่อไป

เมื่อพิจารณาลักษณะทางเกษตรที่เป็นองค์ประกอบของผลผลิต พบว่า สบู่ดำ J117 เป็น accession ที่มีลักษณะโดดเด่นที่สุด เนื่องจากมีจำนวนเมล็ดต่อต้นมากที่สุด (75.38 เมล็ดต่อต้น) น้ำหนักเมล็ดต่อต้นมากที่สุด (40.26 กรัมต่อต้น) และมีจำนวนพูต่อผลมากที่สุด เนื่องจากบางผลมี 4 พู ในขณะที่สบู่ดำส่วนใหญ่มี 3 พู นอกจากนี้ยังมีจำนวนช่อดอกต่อต้นค่อนข้างสูง (อยู่ระหว่าง 3.67-4.34 ช่อต่อต้น) เมื่อเปรียบเทียบกับสบู่ดำทั้งหมดที่มีจำนวนช่อดอกอยู่ระหว่าง 1.22-5.22 ช่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อต้น สบู่ดำ accession นี้อาจนำมาใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการผสมพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำที่ให้ผลผลิตสูงต่อไป

ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางเกษตรทั้ง 23 ลักษณะ พบว่าลักษณะจำนวนเมล็ดต่อต้นมีความสัมพันธ์สูงกับลักษณะจำนวนผลต่อต้น และจำนวนช่อผลต่อต้น และค่อนข้างสัมพันธ์กับความสูงต้น และความกว้างทรงพุ่ม ส่วนน้ำหนักเมล็ดต่อต้นมีความสัมพันธ์สูงกับจำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนผลต่อต้น และจำนวนช่อผลต่อต้น และค่อนข้างสัมพันธ์กับจำนวนพูต่อผล และความหนาของเมล็ด ผลที่ได้จากการทดลองนี้แตกต่างจากผลการทดลองของ Rao *et al*. (2008) ที่พบว่าผลผลิตเมล็ดมีความสัมพันธ์กับสัดส่วนดอกตัวผู้ต่อดอกตัวเมียมากที่สุด (0.789) รองลงมาได้แก่จำนวนกิ่ง และจำนวนวันนับจากวันที่ติดผลจนกระทั่งผลสุก แก่ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นมีสาเหตุมาจาก accession หรือพันธุกรรมของสบู่ดำและสภาพแวดล้อมของแหล่งที่ปลูกทดสอบ (สุรีพร, 2546) ซึ่งจะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะต่าง ๆ (พรชัย, 2549)

Ginwal *et al*. (2004) และ Kaushik *et al*. (2007) ได้รายงานผลการทดลองที่สอดคล้องกันว่าปริมาณน้ำมันในเมล็ดมีความสัมพันธ์ทางบวกอย่างสูงกับน้ำหนักเมล็ด ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำเพื่อให้มีปริมาณน้ำมันสูงควรจะพิจารณาเลือกต้นที่ให้น้ำหนักเมล็ดมาก ในการทดลองนี้พบว่าสบู่ดำ J5 เป็น accession ที่ให้น้ำหนักต่อ 100 เมล็ดสูงที่สุด เฉลี่ยเท่ากับ 64.6 กรัม ดังนั้นสบู่ดำใน accession นี้จึงมีแนวโน้มที่จะให้ปริมาณน้ำมันในเมล็ดสูง และอาจนำไปใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมัน

ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะผลผลิตเมล็ดกับลักษณะทางเกษตรอื่น ๆ ของสบู่ดำ ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบว่าในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้ได้ผลผลิตสูงควรคัดเลือกสบู่ดำที่มีลักษณะลำต้นสูงใหญ่ จำนวนช่อผลต่อต้นมาก จำนวนพูต่อผลสูง ความหนาเมล็ดมาก และน้ำหนักเมล็ดสูง

ผลการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางเกษตร และจัดกลุ่มสบู่ดำโดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายสูงในลักษณะทางเกษตร แต่การใช้ลักษณะทางเกษตรเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน เพราะลักษณะทางเกษตรมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้การแยกระหว่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สายพันธุ์ที่ใกล้ชิดทำได้ยาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำเครื่องหมายดีเอ็นเอหรือลักษณะอื่น ๆ มาใช้ร่วมกันในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (สุรีพร, 2546) อย่างไรก็ตามจากกราฟสองมิติพบว่ามีสบู่ดำบาง accession ที่แยกจาก accession อื่น ๆ อย่างเด่นชัด (ภาพที่ 3) accession ที่แยกออกมาเหล่านี้มีลักษณะทางเกษตรเฉพาะตัวบางประการ เช่นสบู่ดำ J54 ออกดอกเร็วกว่า accession อื่น ๆ สบู่ดำ J23 มีต้นเตี้ยและทรงพุ่มแคบที่สุด ความยาวใบและความยาวก้านใบน้อยที่สุด จำนวนช่อผลต่อต้นและจำนวนผลต่อต้นน้อยที่สุด สบู่ดำ J31 และ J49 มีลักษณะต้นเตี้ย จำนวนช่อดอกต่อต้นค่อนข้างมาก ความกว้างผลค่อนข้างน้อย เมล็ดค่อนข้างยาว และออกดอกช้ามาก สบู่ดำ J96 มีลักษณะต้นเตี้ย จำนวนช่อผลต่อต้นและจำนวนผลต่อต้นมากที่สุด จำนวนช่อดอกต่อต้นและน้ำหนักเมล็ดต่อต้นค่อนข้างสูง และเมล็ดค่อนข้างยาว และสบู่ดำ J117 ที่มีลักษณะทางเกษตรซึ่งเป็นองค์ประกอบของผลผลิตที่โดดเด่นดังที่ได้กล่าวไว้ในตอนต้น

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางเกษตรในครั้งนี้มีประโยชน์อย่างมากต่อการวิจัยเพื่อปรับปรุงสบู่ดำ ตัวอย่างเช่น สบู่ดำ J117 มีลักษณะทางเกษตรที่เป็นองค์ประกอบของผลผลิตที่ดีเด่น แต่ก็ยังมีลักษณะทางเกษตรอื่น ๆ ที่สามารถปรับปรุงให้ดีขึ้นได้ เช่น อายุวันออกดอก อาจทำการปรับปรุงพันธุ์ให้ออกดอกเร็วขึ้นโดยการนำไปผสมพันธุ์กับสบู่ดำ J54 ที่ออกดอกเร็ว หรือผสมพันธุ์กับสบู่ดำ J96 ที่มีช่อผลต่อต้นมากที่สุด หรือผสมพันธุ์กับสบู่ดำ J5 ที่มีน้ำหนักเมล็ดมาก ซึ่งในที่สุดจะช่วยเพิ่มผลผลิตเมล็ดต่อต้นหรือผลผลิตเมล็ดต่อไร่ หรืออาจนำสบู่ดำ J117 ที่มีจำนวนพูต่อผลมากกว่า accession อื่นไปใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ดีนี้ไปยังสบู่ดำ accession อื่น ๆ

เมื่อเปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำ พบว่า ลักษณะทางเกษตรมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามาก ส่วนการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นลักษณะทางคุณภาพสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็นกลุ่ม ๆ ได้ชัดเจนกว่าการใช้ลักษณะทางเกษตรซึ่งเป็นลักษณะทางปริมาณ และการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรอาจสอดคล้องกันหรือไม่ก็ได้ อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางเกษตรสามารถแยก accession ของสบู่ดำซึ่งมีลักษณะที่โดดเด่น และ accession เหล่านี้อาจเป็นเชื้อพันธุกรรมที่มีประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างสบู่ดำในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ อีก 6 ประเทศ รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำกับพืชชนิดอื่น ๆ ที่ใกล้เคียง 4 ชนิด โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP และ ISSR พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก โดยค่าความเหมือนกันทางพันธุกรรมของสบู่ดำอยู่ในช่วง 0.8428-1.00 และจากผลการทดลองทำให้ทราบว่าสบู่ดำมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปัตตาเวียมากที่สุด รองลงมาได้แก่ หนุมานนั่งแท่น ฝิ่นต้น และสบู่แดง ตามลำดับ

จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก และการวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งสบู่ดำออกได้เป็น 2 กลุ่ม ส่วนการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยใช้ลักษณะทางเกษตร พบว่าสบู่ดำมีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง แต่ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มไม่สามารถแบ่งกลุ่มสบู่ดำได้อย่างชัดเจน

ข้อเสนอแนะ

สบู่ดำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำควรจะมีการนำเข้าเชื้อพันธุกรรมสบู่ดำจากต่างประเทศหรือทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือผสมข้ามกับพืชชนิดอื่นเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมให้กับสบู่ดำก่อนที่จะเริ่มการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะความต้องการ ซึ่งจะช่วยเพิ่มโอกาสที่จะประสบความสำเร็จมากขึ้นในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ

จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยใช้ลักษณะทางเกษตร พบว่าสบู่ดำ J117 ที่รวบรวมไว้มีลักษณะทางเกษตรที่เป็นองค์ประกอบของผลผลิตที่ดีเด่น ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตเพิ่มสูงขึ้นได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรึก นฤทุม. 2549. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์, น.12-17. *ใน* ชำนาญ ฉัตรแก้ว, บรรณาธิการ. **สบู่ดำ : พืชพลังงาน**. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

กรมธุรกิจพลังงาน. 2556. **สรุปการผลิต นำเข้า จำหน่าย และส่งออกน้ำมันเชื้อเพลิง ปี 2555**. กระทรวงพลังงาน. แหล่งที่มา: www.doeb.go.th/, 3 ธันวาคม 2556.

จรัลธาดา กรรณสูต. 2547. โปรแกรมความหลากหลายทางชีวภาพของระบบนิเวศแหล่งน้ำในแผ่นดิน, น. 58-61 *ใน* **รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการวันสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพ: อาหาร น้ำ และสุขภาพ.** กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

ชนวน รัตนวราหะ. 2537. นิเวศน์ธรรมชาติกับการเกษตรกรรม : ความหลากหลายทางชีวภาพและความสมดุล, น.167-202. *ใน* วิวัฒน์ คติธรรมนิตย์, บรรณาธิการ. **ความหลากหลายทางชีวภาพกับการพัฒนาอย่างยั่งยืน.** สถาบันชุมชนท้องถิ่นพัฒนา, กรุงเทพฯ.

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล. 2538. เทคนิคการตรวจสอบและจำแนกพันธุ์โดยใช้ Isozyme pattern, น. 16-32. *ใน* **เอกสารประกอบการศึกษาอบรมทางวิชาการการตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme pattern และ RAPD.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ชำนาญ ฉัตรแก้ว. 2549. สบู่ดำ, น.1-11. *ใน* ชำนาญ ฉัตรแก้ว, บรรณาธิการ. **สบู่ดำ : พืชพลังงาน.** ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่ พับพลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

ดวงพร วรสุนทรโรสถ. 2538. DNA เอ็นไซม์และโปรตีนในพืช, น.1-11. *ใน* **เอกสารประกอบการศึกษาอบรมทางวิชาการการตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme pattern และ RAPD.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

เทียมใจ คมกฤส. 2546. **กายวิภาคของพฤกษ์.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นินนาท ไชยธีรภิญโญ. 2548. **ยุทธศาสตร์สบู่ดำน้ำมันบนดินพลังงานทดแทนทางออกประเทศไทย.** แหล่งเรียนรู้สำหรับครูนักเรียน. แหล่งที่มา: http://www.thaienvi.net, 12 ธันวาคม 2549.

บริบูรณ์ สัมฤทธิ์. 2547. ข้าวกับความหลากหลายทางชีวภาพ. น. 12-23 *ใน* **รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการวันสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพ : อาหาร น้ำและสุขภาพ.** กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน. 2547. โปรแกรมงานความหลากหลายทางชีวภาพทางการเกษตรและความปลอดภัยทางชีวภาพ, น. 44-57 *ใน* **รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการวันสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพ : อาหาร น้ำและสุขภาพ.** กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

ประภา ศรีพิจิตต์. 2550. **เซลล์พันธุศาสตร์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประเวศ วะสี. 2537. ความหลากหลายทางชีวภาพ สัจจธรรม และการศึกษาที่เข้าถึงความจริง, น.11-17. *ใน* วิวัฒน์ คติธรรมนิตย์, บรรณาธิการ. **ความหลากหลายทางชีวภาพกับการพัฒนาอย่างยั่งยืน.** สถาบันชุมชนท้องถิ่นพัฒนา, กรุงเทพฯ.

ประโยชน์ ตันติเจริญยศ. 2549. ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ของสบู่ดำ, น. 93-99. *ใน* ชำนาญ ฉัตรแก้ว, บรรณาธิการ. **สบู่ดำ : พืชพลังงาน.** ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่ พับพลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล. 2551. **ไบโอดีเซล : พลังงานทางเลือก.** แหล่งที่มา: http://www.tistr.or.th, 16 มกราคม 2552.

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2555. วิจัยสบู่ดำพันธุ์ใหม่เพิ่มน้ำมันเป็น 2 เท่า. E-cite thaipost. แหล่งที่มา: http://www.thaipost.net/x-cite/141211/49609, 17 มกราคม พ.ศ. 2555.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. **สบู่ดำเพื่อไบโอดีเซล.** สำนักมติชน, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พัชรินทร์ ตัญญะ, สนธิชัย จันทร์เปรม, สมบัติ ชิณะวงศ์ และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2551. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์สบู่ดำในเอเชียจากการประเมินโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD. **ว. วิชาการเกษตร** 26: 36-47.

ไพจิตร จันทรวงศ์. 2530. **พืชน้ำมันและน้ำมันพืช 52 ชนิด.** โรงพิมพ์คุรุสภา, กรุงเทพฯ.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2525. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2531. เทคนิคทางอิเลคโทรโฟริซิสในการจำแนกพันธุ์, น.17-33. *ใน* **เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการเทคนิคทางอิเลคโทรโฟรีซิสในการจำแนกพันธุ์พืช.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ยุคลธร สถาปนศิริ. 2542. **การวิเคราะห์จีโนมของพืชในสกุล *Garcinia* โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ระพีพันธุ์ ภาสบุตร. 2544. การใช้น้ำมันสบู่ดำกับเครื่องยนต์ดีเซลในไร่นา, น.1-4. *ใน* **เอกสารประกอบการอบรมโครงการนำร่องการใช้น้ำมันสบู่ดำกับเครื่องยนต์ดีเซล.** ศูนย์ส่งเสริมจักรกลการเกษตรชัยนาท, ชัยนาท.

_____ และสุขสันต์ สุทธิผลไพบูลย์. 2546. ประวัติสบู่ดำพลังงานทดแทน. **เกษตรก้าวหน้า** 3: 76-81.

วิบูลย์ เทเพนทร์. 2552. **การวัดความชื้นเมล็ดพืช**. กลุ่มงานวิจัยวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยว. แหล่งที่มา: http://www.as.doa.go.th, 5 มกราคม 2553.

วิภา หงษ์ตระกูล. 2549. การวิเคราะห์ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายและการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์, น.1-33. *ใน* **เอกสารประกอบการศึกษาอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิมลรัตน์ ศุกรินทร์, วิไลรัตน์ กุลพัชรานุรักษ์ และมณเฑียร โสมภี. 2534. การเปรียบเทียบเบื้องต้นสบู่ดำ, น. 160-164. *ใน* **รายงานผลการวิจัยประจำปี 2534 พืชเศรษฐกิจ.** ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. **พันธุศาสตร์.** เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

_____. 2538. **สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย.** สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ.

ศิราวุธ กลิ่นบุหงา. 2544. Phylogenetics และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต, น. 149-171. *ใน* ศิราวุธ กลิ่นบุหงา, บรรณาธิการ. **ชีวสารสนเทศศาสตร์**. สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร, วิภา หงษ์ตระกูล, นิตย์ศรี แสงเดือน, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, แอนนา สายมณีรัตน์, ประภา ศรีพิจิตต์, วิเชียร กีรตินิจกาล และ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2550. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสบู่ดำโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี. น. 21-22. *ใน* การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ณ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. วันที่ 29-30 พฤษภาคม 2550.

_____, ประภา ศรีพิจิตต์, วิภา หงษ์ตระกูล และรังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2555. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตร. **ว. วิทย. กษ**. 43(2-3): 267-278.

ศุภวิทย์ เปี่ยมพงศ์สานต์. 2546. ความหลากหลายทางชีวภาพกับการขจัดปัญหาความยากจนเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน. น. 12-17 *ใน* **รายงานการประชุมวันสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพกับการขจัดปัญหาความยากจนเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน.** กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศูนย์ส่งเสริม และพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดชัยนาท. 2550. **สบู่ดำ**. สนุกพีเดีย. แหล่งที่มา: http://guru.sanook.com/pedia/topic, 25 มกราคม 2553.

สุขสันต์ สุทธิผลไพบูลย์. 2551. **สบู่ดำในต่างประเทศ.** Thai Environment. แหล่งที่มา: http://www.thaienv.com/th, 20 กุมภาพันธ์ 2552.

สุปรียา ศุขเกษม. 2553. **การใช้ประโยชน์จากน้ำมันสบู่ดำการใช้ประโยชน์จากสบู่ดำ.** น้ำมันสบู่ดำ. แหล่งที่มา: http://as.doa.go.th/fieldcrops/phinut/util, 1 กุมภาพันธ์ 2553.

สุภาภรณ์ ปิติพร. 2546. สมุนไพร, น. 73-77 *ใน* **รายงานการประชุมวันสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพกับการขจัดปัญหาความยากจนเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน.** กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2540. การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล, น. 57-82. *ใน* **การอบรมการจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล**. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี.

_____ . 2545ก. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2545ข. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** พิมพ์ครั้งที่1**.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **วิชาการ ม.อบ.** 5(2): 37-58.

สมศักดิ์ สุขวงศ์. 2537. การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้, น. 51-74. *ใน* วิวัฒน์ คติธรรมนิตย์, บรรณาธิการ. **ความหลากหลายทางชีวภาพกับการพัฒนาอย่างยั่งยืน.** สถาบันชุมชนท้องถิ่นพัฒนา, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำนักนโยบายและแผนพลังงาน. 2550. **สถานการณ์พลังงานในปี 2550 และแนวโน้มปี 2551**. หน้าต่างโลกพลังงาน. กระทรวงพลังงาน. แหล่งที่มา: http://www.pttplc.com, 20 มีนาคม 2551.

สำนักจัดการคุณภาพอากาศและเสียง. 2553. **ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์**. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. แหล่งที่มา: http://www.aqnis.pcd.go.th, 23 มกราคม 2553.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2556. **ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์**. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. แหล่งที่มา: http://www.qsbg.org/database/botanic, 3 ธันวาคม 2556.

แอนนา สายมณีรัตน์, พิทยาภรณ์ สุภรพัฒน์, สุปราณี งามประสิทธิ์, แสงแข น้ำวานิช, สุขุม โชติช่วงมณีรัตน์, ฉัตรพงษ์ บาลลา และเอ็จ สโรบล. 2549. การรวบรวมพันธุ์สบู่ดำจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นเชื้อพันธุกรรม, น. 3-23. *ใน* **การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่44 (สาขาพืช).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, _____ และวิเชียร กีรตินิจกาล. 2550ก. การเปรียบเทียบผลผลิตเบื้องต้นสายพันธุ์สบู่ดำ, น. 423-430. *ใน* **การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่45 (สาขาพืช).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, _____, สุปราณี งามประสิทธิ์, แสงแข น้ำวานิช, สุขุม โชติช่วงมณีรัตน์ และวิเชียร กีรตินิจกาล. 2550ข. ผลผลิตและลักษณะทางเกษตรของเชื้อพันธุ์สบู่ดำของโครงการเคยูไบโอดีเซล, น. 23-33. *ใน* **การประชุมทางวิชาการสบู่ดำแห่งชาติครั้งที่ 1**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2547. ความหลากหลายทางชีวภาพกับสุขภาพ, น.24-31 *ใน* **รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการวันสากลแห่งความหลากหลายทางชีวภาพ เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพ : อาหาร น้ำและสุขภาพ.** กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Basha, S. D. and M. Sujatha. 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.

Becker, K. 1999. **Studied on propagation of non-toxic variety of *Jatropha curcas*** L. Available source: http://www. dovebiotech.com, 25 September 2007.

Benge, M. 2006. **Assessment of the potential of *Jatropha curcas* (biodiesel tree) for energy production other uses in developing countries**. Agroforesty, USAID.

Blair, M. W., O. Panaud and S. R. Mc. Couch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice. **Theor. Appl. Genet**. 98: 780-792.

Bornet, B., C. Muller, F. Paulus and M. Branchard. 2002. High informative nature of inter simple sequence repeat(ISSR) sequences amplified with tri- and tetra-nucleotide primers form cauliflower(*Brassica oleracea* var. botrytis L.). **Genome** 45: 890-896.

Brown, S. M., A. K. S. McFadden and S. Kresovish. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis, pp. 147-159. ***In*** P.P. Jauhar, ed. **Methods of plant genome analysis: Their merits and pitfalls.** CRC Press, Miami.

Burdon, J. J. and J. K. Robert. 1995. The population genetic structure of rust fungus *Melampsora lini* as revealed by pathogenicity, isozyme and RFLP markers. **Plant Pathol.** 44: 270-278.

_____, G. Francis, H.P.S. Makkar, K. Becker and M. Sujatha. 2009. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Sci.** 176: 812–823.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Caetano-Anolles, G. 1997. Resolving DNA amplification products using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, pp. 119-134. *In* R. M. Michael and R. Bova, eds. **Fingerprinting methods based on PCR**. Springer-Verlag, Heidelberg.

Cai, Y., D. Sun, G. Wu and J. Peng. 2010. ISSR-based genetic diversity of *Jatropha curcas* germplasm in China. **Biomass Bioenerg**. 7: 1-12.

Carlier , J. D., A. Reis, M. F. Duval, G.C. Deeckenbrugge and J. M. Leitao. 2003. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *Ananas comosus* using the pseudo-testcross strategy. **Plant Breed.** 123(2): 186-192.

Debnath, M. and P.S., Bisen. 2008. *Jatropha curcas* L., a multipurpose stress resistant plant with a potential for ethnomedicine and renewable energy. **Curr. Pharm. Biotechnol**. 9(4) : 288-306.

Dehgan, B. 1984. Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Syst. Bot.** 9: 467–478.

Dehgan, B. and B. Schutzman. 1994. Contributions toward a monograph of neotropical *Jatropha*: phonetic and phylogenetic analysis. **Ann. Miss. Botanic Garden** 81: 349-369.

Dellaporta, S., L. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Mol. Biol. Rep.** 1: 19-21.

Despres, L., L. Gielly, B. Redoutet and P. Taberlet. 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationship in a photogically diversified plant species complex when nulear and chloroplast sequences fail to reveal variability. **Mol. Phylogenet. Evol**. 27(2): 185-196.

FAO. 1998. **The State of World's Plant Genetic Resoures for Food and Agriculture**. FAO, Rome.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Fang, D. Q., M. L. Roose, R. R. Krueger and C. T. Federici. 1997. Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers. **Theor. Appl. Genet**. 95: 211-219.

Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theor. Appl. Genet**. 95: 408-417.

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.

Galvan, M. Z., B. Bornet, P. A. Balatti and M. Branchard. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica** 132: 297-301.

Ganesh Ram, S., K. T. Parthibam., R. S. Kumar., V. Thaieuvengadam and M. Paramathma. 2008. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genet. Resour. Crop Evol**. 55: 803-809.

Ginwal, H.S., P.S. Rawat and R.L. Srivastava. 2004. Seed source variation in growth performance and oil yield of *Jatropha curcas* Linn. in central India. **Silvae Genet**. 53: 186-192.

Ginwal, H. S., P. S. Phartyal and R. L. Srivastava. 2005. Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas* Linn. in central India. **Silvae Genetica** 54: 76-80.

Grativol C., C. de Fonseca Lira-Medeiros, A.S. Hemerly and P.C.G. Ferreira. 2010. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Mol. Biol. Rep.** DOI 10.1007/s11033-010-0547-7.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gübitz, G. M., M. Mittelbach and M. Trabi. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bio. Tech**. 67: 73-82.

Hale A. L. and J. C. Miller. 2005. Suitability of AFLP and microsattelite marker analysis for discriminating intraclonal variants of the potato cultivar Russet Norkotah**. J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 130(4): 624-630.

Heller, J. 1996. **Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops 1. Physic Nut (*Jatropha curcas* L)**. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

Henning, R. K. 2004. **The *Jatropha* system, integrated rural development by utilization of *Jatropha curcas* L. (JCL) as raw material and as renewable energy**. Available Source: http://www.*Jatropha*.Org, September 20, 2007.

Henning, R. K. 2009. **The *Jatropha* System - An integrated Approach of Rural Development**. Available Source: http://www.newcrops.uq.edu.au/listing/jatrophacurcas.htm, December 4, 2014.

Hongtrakul V., G. M. Huestis, and S. J. Knapp. 1997. Amplified fragment length polymorphism as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. **Theor. Appl. Genet.** 95: 400–407.

Johnton, B. 1997. **Baskets**. The Seri Indian of Sonora Mexico. Available Source: http://www.uapress.arizona.edu/onlinebks/baskets.htm, March 10, 2010.

Joker, D. and J. Jepsen. 2003. ***Jatropha curcas* L. Seed Leaflet no. 83.** Danida Forest Seed Certer. Available Source: http:// www.ias.ac.in/currsci, March 30, 2009.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kaushik, N., K. Kumar and S. Roy. 2007. Genetic variability and divergent studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. **Biomass Bioener**. 31: 497-502.

Kiefer, J. 1986. **Die Purgiernu (*Jatropha curcas* L.) Ernteprodukt, Verwendungsalternativer, Wirtschaftliche Uberlegungen**. M.E. Thesis, University Hohenheim.

Kumar, A. and S., Sharma. 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial Crops and Products**. 28(1) : 1–10.

Mc Gregor, C. E., C. A. Lambert, M. M. Greyling, J. H. Louw and L. Warnich. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). **Euphytica** 113: 135-144.

Mastan, S.G., P.D. Sudheer, H. Rahman, A. Ghosh, M.S. Rathore, C.h.R. Prakash and J.Chikara. 2012. Molecular characterization of intra-population variability of *Jatropha curcas* L. using DNA based molecular markers. **Mol Biol Rep**. 39(4):4383-4390.

Matthes, M., R. Singh, S. C. Cheah and A. Karp. 2001. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation –sensitive enzymes. **Theor. Appl. Genet**. 102: 971-979.

Michael, D. P. 2006. **Biodiesel Crop Implementation in Hawaii.** Hawaii Agriculture Research Center, Hawaii.

Morgante, M. and A. M. Olivieri, 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics**. Plant J**. 3:175-182.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mueller, U. G. and L. L. Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree** 14: 389-394.

Noyer, J. L., S. Causse, K. Tomekpe, A. Bouet and F. C. Baurens. 2005. A new image of plantation diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers. **Genetica** 124: 61-69.

Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas* an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass Bioener.** 19: 1–15.

Pamidiamarri, D. V. N. S., N. Pandya, M. P. Reddy and T. Radhakrishnan. 2010. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. **Mol. Biol. Rep**. 36: 901-907.

Pant, K. S., V. Khosla, D. Kumar and S. Gailora. 2006. Seed oil content variation in *Jatropha curcas* L. in different altitudinal ranges and site conditions in H. P. India. **Lyonia** 11: 31-34.

Paterson, A. H. 1996. **Genome Mapping in Plants.** Academic Press, Austin.

Powell, W., C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci**. 1: 215-222.

Prabakaran, A. J. and M. Sujatha. 1999. *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja, a natural interspecific hybrid occurring in Tamil Nadu, India. **Genet. Res. Crop Evol**. 46 : 213-218.

Prakash, A.R., J.S. Patolia, J. Chikara and G.N. Boricha. 2007. Flower biology and flowering behavior of *Jatropha curcas,* pp. 26-28. *In* **Exert seminar on *Jatropha curcas* L. fact foundation**. Wageningen.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Punia, M.S. 2007. Current status of research and development on Jatropha (*Jatropha curcas*) for sustainable biofuel production in India. *In* **USDA Global Conference on Agricultural Biofuels: Research and Economics**, August 20-22, 2007. Minneopolis, Minnesota.

Rao, G. R., G. R. Karvar, A. K. Shanker and Y. S. Ramakrishna. 2008. Genetic associations, variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenogy and yield in *Jatropha curcas* (L.) accessions. **Trees** 22: 697-709.

Ratree, S. 2004. A preliminary study on physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand. **Pakistan J. Biol. Sci.** 7: 1620-1623.

Rupert, E.A., B. Dehgan and G.L. Webster. 1970. Experimental studies of relationships in the genus Jatropha. I. *J. curcas* x *J. integerrima*. **Bull. Torrey Bot. Club** 99: 321–325.

Saiki, R.K. 1985. Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230: 1350-1354.

Saini, N., N. Jain, S. Jain and R. K. Jain. 2004. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. **Euphytica** 140: 133-146.

Seyis, F., R. J. Snowdon, W. Luhs and W. Friedt. 2003. Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparision with spring rapeseed cultivar. **Plant Breed.** 122: 473-478.

Shen, J., X. Jia, H. Ni, P. Sun, S. Niu and X. Chen. 2010. AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* grown in Hainan, China. **Trees** 24: 455-462.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Shena, J., K. Pinyopusarerk, D. Bushb and X. Chenc. 2012. AFLP-based molecular characterization of 63 populations of *Jatropha curcas* L. grown in provenance trials in China and Vietnam. **Biomass Bioenerg.** 37: 265–274.

Sneath, P.H. and R.R. Sokal., 1973. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco.

Sokal, R.R. and P.H. Sneath., 1963. **Principles of Numerical Taxonomy.** Freeman, San Francisco.

Soontornchainaksaeng, P. and T. Jenjittikul. 2003. Karyology of *Jatropha* (Euphorbiaceae) in Thailand. **Thai. For. Bull. Bot.** 31: 105–112.

Subramanian, K.A., S. K. Singal, M. Sexena and S. Singhal. 2005. Utilization of liquid biofuels in automotive diesel engines: an Indian perspective. **Biomass Bioener**. 29: 65-72.

Sujatha, M., and A.J. Prabakaran. 2003. New ornamental *Jatropha* hybrids through inspecific hybridization. **Gene Res.Crop Evol**. 50: 75-82.

Sun, Q-B., L-F. Li, Y. Li, G-J. Wu and X-J. Ge**.** 2008. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Sci**. 48: 1865-1871.

Swingland, I. R. 2001. Biodiversity, definition, p**.** 377-381. *In* S. A. Lavin, ed. **Encyclopedia of Biodiversity** 1. Acadamic Press, San Diego.

Tanya, P., P. Taeprayoon, Y. Hadkam and P. Srinives. 2010. Genetic Diversity Among *Jatropha* and *Jatropha*-Related Species Based on ISSR Markers**. Plant Mol. Biol. Rep.** 29: 252-264.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tatikonda, L., S. P. Wani, S. Kannan, N. Beerelli, T. K. Sreedevi, D.A. Hoisington, P. Devi, and R.K. Varshney. 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Sci.** 176: 505-513.

Torre-Cuadros, M. de L. A. La and G.A. Islebe. 2003. Traditional ecological knowledge and use of vetgetation in southeastern Mexico: a case study from Solferino, Quintana Roo. **Biodivers. Conserv**. 12: 2455-2476.

Vander Nest, M. A., E. T. Steenkamp, B. D. Wingfield and M. J. Wingfield. 2000. Development of simple sequence repeat(SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter simple sequence repeats(ISSR). **Plant Breed.** 119: 433-436.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabean. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nuc. Acid Res**. 23: 4407-4414.

Zhang, Z., X. Guo, B. Liu, L. Tang and F. Chen. 2011. Genetic diversity and genetic relationship of *Jatropha curcas* between China and Southeast Asian revealed by amplified fragment length polymorphisms. **African J. Biotechnol.** 10: 2825-2832.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomes** 20: 176-183.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นายศิริศักดิ์ สุนทรยาตร
เกิดวันที่	20 เมษายน 2505
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีการผลิตพืช) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
	วท.ม. (พืชสวน) สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรี
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (พ.ศ. 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์