



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่

พืชไร่นา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในเมล็ดสบู่ดำ

Inheritance of Phorbol Esters Content in Jatropha Seeds (*Jatropha curcas* L.)

นามผู้วิจัย นางสาวอังคณา จงเชิดชูตระกูล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัชรินทร์ ตัญญา, ประ.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์พระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์นรินทร์ อุดมประเสริฐ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ในเมล็ดสนุ่นดำ

Inheritance of Phorbol Esters Content in Jatropha Seeds (*Jatropha curcas* L.)

โดย

นางสาวอังคณา จงเชิดชูตระกูล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

พ.ศ. 2555

อังคณา จงเชิดชูตระกูล 2555: การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์
ในเมล็ดสนุ่นดำ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ นา อาจารย์ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัชรินทร์ ตัญญา, ปร.ด. 68 หน้า

สารฟอรับอลเอสเทอร์ (PEs) เป็นสารพิษหลักที่มีอยู่ในเมล็ดสนุ่นดำ ซึ่งไม่สามารถสลายตัวได้ด้วย
ความร้อน ดังนั้น วิธีการที่จะลดปริมาณสารดังกล่าว ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์จากสนุ่นดำคือ ใช้วิธีการ
ปรับปรุงพันธุ์ โดยต้องทราบก่อนว่า สารนี้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมอย่างไร เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการ
ปรับปรุงสนุ่นดำต่อไปในอนาคต งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ PEs ในเมล็ดสนุ่นดำที่เหมาะสมเพื่อ
ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์สนุ่นดำ โดยเปรียบเทียบตัวทำละลาย ได้แก่ เมทานอล สำหรับ HPLC grade และ
analytical grade เปรียบเทียบน้ำหนักตัวอย่าง ได้แก่ 4, 5 และ 6 กรัม โดยใช้สนุ่นดำ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์
ชัยนาท โคราซ อินเดีย KUBP พม่า 1 พม่า 2 เวียดนาม เม็กซิโก 6 เม็กซิโก 85 และเม็กซิโก 87 และส่วนต่าง ๆ
ของเมล็ดสนุ่นดำ ได้แก่ เนื้อในเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ด และทั้งเมล็ด พบว่า วิธีการที่เหมาะสมคือ การใช้เมทานอล
analytical grade เป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร PEs แทนการใช้ เมทานอล HPLC grade และ น้ำหนักตัวอย่าง
ที่ใช้สามารถลดลงจาก 6 กรัม เป็น 4 กรัม

การศึกษา xenia effect ของลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสนุ่นดำ จากการผสมพันธุ์โดยใช้สายพันธุ์
ที่มีปริมาณสาร PEs สูง (สายพันธุ์ไทย ได้แก่ สายพันธุ์ชัยนาท โคราซ และแพร่) และ สายพันธุ์ที่มีปริมาณสาร
PEs ต่ำ (สายพันธุ์เม็กซิโก) จำนวนทั้งหมด 6 คู่ผสม โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสาร PEs ที่ได้จากการ
ทดลองที่ 1 สามารถสรุปได้ว่า ไม่มี xenia effect ในลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสนุ่นดำ เนื่องจากลูกผสมที่
ได้มีปริมาณสาร PEs เหมือนแม่ ไม่ว่าจะได้รับการผสมจากสายพันธุ์พ่อต้นใดก็ตาม

การศึกษากายถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสนุ่นดำ ในลูกผสมรุ่น F_2
จากการผสมตรงและสลับด้วยสายพันธุ์ชัยนาทและเม็กซิโก สามารถสรุปได้ว่า ลักษณะปริมาณสาร PEs เป็น
ลักษณะเชิงปริมาณ ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลสูงต่อการแสดงออกของลักษณะ

Angkana Jongcherdchutrakul 2012: Inheritance of Phorbol Esters Content in Jatropha Seeds (*Jatropha curcas* L.). Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Assistant Professor Patcharin Tanya, Ph.D. 68 pages.

Phorbol esters (PEs) are toxic compound in jatropha seeds that cannot be destroyed by heat treatment. An effective approach to reduce PEs is through plant breeding. To perform selection effectively on PEs content, the plant breeder should know about the inheritance of it as a background information in jatropha breeding. In this study, the first experiment was conducted to compare the protocols used for extraction of PEs from jatropha seed for jatropha breeding program. Two extraction solvents i.e. methanol of HPLC and analytical grades were compared using seed sample weights of 4, 5 and 6 grams. The jatropha varieties were used, viz. Chainat, Korat, India, KUBP, Myanmar 1, Myanmar 2, Vietnam, Mexico 6, Mexico 85 and Mexico 87. Their seeds were divided into kernel, seed coat and whole seed for extraction. The result showed that the optimal method was using analytical grade methanol as the extraction solvent for 4 grams of sample weight.

The second experiment was set up to study on xenia effect of PEs content in jatropha seeds. F_1 seeds from 6 crosses between high PEs varieties (Chainat, Korat and Phrae) and low PEs varieties (Mexico) were analyzed using extraction method from the first experiment. The results showed no xenia effect in the F_1 seeds from all crosses. Thus seed set on low PE plants are always low in PEs regardless of pollen source.

The third experiment was planned to study on inheritance of PEs content in jatropha seeds. The F_2 seeds from direct and reciprocal crosses of Chainat and Mexico varieties were used. The results showed that, PEs contents in F_2 seeds were continuously distributed. It can be considered as a quantitative trait which is influenced by multiple genes and environment.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พชรินทร์ ตัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำแนะนำเรื่องการเรียนและการทำงานวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนตรวจทานและแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางแก้ปัญหาในการทดลอง ตลอดจนตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ นิตรวชิระวงษ์ ประธานในการสอบ และ ดร. ชีรยุทธ ตูจันดา ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ โครงการสร้างขีดความสามารถด้านการวิจัยและพัฒนาและการแข่งขันของภาคอุตสาหกรรมโดยกลไกความร่วมมือระหว่างภาครัฐ เอกชน และมหาวิทยาลัย (University Industry Research Collaboration Program: U-IRC) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่สนับสนุนเงินทุนการศึกษาและเงินทุนวิจัย และบริษัท Protector Nutrition (Thailand) จำกัด ที่สนับสนุนเครื่องมือและเงินทุนบางส่วนในการทำวิจัย รวมทั้งการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ภายใต้โครงการเปรียบเทียบผลผลิตและปริมาณน้ำมันของลูกผสมข้ามชนิดในสกุล *Jatropha* เพื่อใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล และ ผลการวิจัยของโครงการได้รับการสนับสนุนเงินทุนอุดหนุน ภายใต้โครงการทุน NSTDA Chair Professor ประจำปี ๒๕๕๔ ที่เกิดจากความร่วมมือกันระหว่าง มูลนิธิสำนักงานทรัพย์สินส่วนพระมหากษัตริย์และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ขอขอบคุณสมาชิกโครงการปรับปรุงพันธุ์สับดูดำ และปาล์มน้ำมัน ที่คอยให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ อย่างดีเสมอมา

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรมและให้กำลังใจข้าพเจ้าในทุกเรื่องตลอดมา

อังคณา จงเชิดชูตระกูล

เมษายน 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	18
อุปกรณ์	18
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	32
สรุป	43
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	44
ภาคผนวก	50
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้บนต้นแม่	26
2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณสาร PEs ในน้ำมันสบู่ดำจากส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดสบู่ดำ (P) ได้แก่ เมล็ด (whole seed) เนื้อในเมล็ด (kernel) และเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ของสบู่ดำ 10 สายพันธุ์ (V) โดยใช้ตัวทำลาย (S) ที่แตกต่างกัน ได้แก่ เมทานอล HPLC grade และ analytical grade และน้ำหนักตัวอย่าง (W) 3 ระดับ คือ 4, 5 และ 6 กรัม	36
3	การตรวจสอบค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร PEs จากส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดสบู่ดำทั้ง 10 สายพันธุ์ แบบคั่นแกน (Duncan's Multiple Range Test; DMRT)	37
4	การแสดงผลของละอองเกสรเพศผู้บนต้นแม่ (xenia effect) ในลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสบู่ดำ	39
5	การจัดอันดับการขึ้นของปริมาณสาร PEs ในสบู่ดำลูกผสม 78 ต้น	42
ตารางผนวกที่		
1	ปริมาณสาร PEs ในเนื้อในเมล็ด (kernel) ที่สกัดด้วยเมทานอล HPLC grade	51
2	ปริมาณสาร PEs ในเนื้อในเมล็ด (kernel) ที่สกัดด้วยเมทานอล analytical grade	53
3	ปริมาณสาร PEs ในเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ที่สกัดด้วยเมทานอล HPLC grade	55
4	ปริมาณสาร PEs ในเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ที่สกัดด้วยเมทานอล analytical grade	57
5	ปริมาณสาร PEs ในเมล็ด (whole seed) ที่สกัดด้วยเมทานอล HPLC grade	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
6	ปริมาณสาร PEs ในเมล็ด (whole seed) ที่สกัดด้วยเมทานอล analytical grade	61
7	ปริมาณสาร PEs ในเมล็ดลูกผสมรุ่น F_2 จำนวน 27 ต้น จากการใช้สายพันธุ์ชันนาทเป็นแม่และเม็กชิโกเป็นพ่อ (direct cross)	63
8	ปริมาณสาร PEs ในเมล็ดลูกผสมรุ่น F_2 จำนวน 51 ต้น จากการใช้สายพันธุ์เม็กชิโกเป็นแม่และชันนาทเป็นพ่อ (reciprocal cross)	64

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของ tiglic acid	7
2	ปฏิกิริยาการเกิดสาร PEs	7
3	สูตรโครงสร้างของ PEs ชนิด DHPB	8
4	สูตรโครงสร้างของ PEs ชนิดต่าง ๆ ในน้ำมันสบู่ดำ	9
5	HPLC chromatogram ของ PEs ในน้ำมันสบู่ดำ	10
6	สูตรโครงสร้างของ PEs ชนิด TPA	10
7	โครมาโตแกรมของสาร PEs ที่พบในน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดและเนื้อในเมล็ดของสบู่ดำสายพันธุ์ที่มีสาร PEs สูง	34
8	โครมาโตแกรมของสาร PEs ที่พบในน้ำมันที่สกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดของสบู่ดำสายพันธุ์ที่มีสาร PEs สูง และน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดเนื้อในเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดของสบู่ดำสายพันธุ์ที่มีสาร PEs ต่ำ	34
9	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 4 β , 9 α , 12 β , 13 α , 20-pentahydroxytiglic-1, 6-dien-3- on-12 β -myristate-13 acetate (TPA)	35
10	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วย SSR marker MPN 6 และ 7 ใน 4.5% polyacrylamide gel	40
11	การกระจายตัวของปริมาณสาร PEs ในสบู่ดำลูกผสมสบู่ดำ 78 ต้น	42

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ในเมล็ดสบู่ดำ

Inheritance of Phorbol Esters Content in *Jatropha* Seeds (*Jatropha curcas* L.)

คำนำ

วิกฤติการณ์ขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงกำลังเป็นปัญหาที่สำคัญของโลก จึงมีการนำน้ำมันไบโอดีเซลมาใช้เป็นพลังงานทดแทน น้ำมันไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากน้ำมันจากพืชหรือไขมันสัตว์ โดยหนึ่งในวัตถุดิบที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก คือ สบู่ดำ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ไม่สามารถนำมาบริโภคได้ ถ้านำมาใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลก็จะไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้บริโภคของมนุษย์ (Makkar *et al.*, 1998a) เมล็ดของสบู่ดำ มีน้ำมัน 30-40 % มีเนื้อในเมล็ดอยู่ประมาณ 65 % ประกอบด้วยโปรตีน ประมาณ 27-32 % และไขมันประมาณ 58-60 % (Aderibigbe *et al.*, 1997) ซึ่งน้ำมันที่บริโภคไม่ได้นี้ สามารถนำมาแปรรูปเป็นน้ำมันไบโอดีเซลได้ง่ายและมีคุณสมบัติตรงตามมาตรฐานของอเมริกาและยุโรป (Azam *et al.*, 2005) นอกจากนี้ กากสบู่ดำ (press cake) ที่เหลือหลังจากการสกัดน้ำมัน ยังมีโปรตีนประมาณ 53-63 % ซึ่งถือว่าสบู่ดำเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีโอกาสที่จะใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์เลี้ยงได้ (Makkar and Becker, 1997) แต่เนื่องจากเมล็ดและส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำประกอบไปด้วยสารพิษฟอรับอลเอสเทอร์ (phorbol esters) และ antinutritional factors (trypsin inhibitor, phytate, lectin และ curcin) ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์ประการหนึ่ง (Makkar *et al.*, 1998b) โดยเฉพาะ phorbol esters (PEs) ซึ่งเป็นสารพิษหลักที่มีอยู่ในสบู่ดำ ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนเนื้อในเมล็ด (kernel) จึงมีความจำเป็นที่จะต้องกำจัดสารนี้ออกหรือมีการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีสารดังกล่าวต่ำ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีความเป็นไปได้ที่ผู้ที่จะสัมผัสกับน้ำมัน ทำให้มีโอกาสได้รับสารนี้เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดเซลล์มะเร็งได้ (Aregheore *et al.*, 2003) ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสบู่ดำเพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ (PEs) ในเมล็ดสบู่ดำที่เหมาะสมกับงานปรับปรุงพันธุ์
2. เพื่อศึกษา xenia effect ของลักษณะปริมาณสาร PEs
3. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสบู่ดำ

การตรวจเอกสาร

สบู่ดำ

สบู่ดำ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. เป็นไม้พุ่มทนแล้ง อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีถิ่นกำเนิดในเม็กซิโก และอเมริกากลาง พบการแพร่กระจายพันธุ์โดยนักเดินเรือชาวโปรตุเกส ผ่านทางหมู่เกาะ Cape Verde และ Guinea Bissau ไปยังประเทศอื่น ๆ ในแถบแอฟริกา และเอเชีย (Heller, 1996) สบู่ดำปลูกอย่างแพร่หลายในอเมริกากลาง อเมริกาใต้ อินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Schmook and Perez, 1997) สำหรับประเทศไทย มีการนำเข้ามาปลูกตั้งแต่สมัยกรุงศรีอยุธยาตอนปลาย หรือประมาณ 300 ปี ที่ผ่านมา เพื่อนำเมล็ดไปบีบอัดเอาน้ำมันมาทำสบู่ สบู่ดำ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น เช่น ภาคกลางเรียก สบู่ดำ ภาคเหนือ เรียกมะหุ้งฮั่ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียกหมากเข้า มะเข่า และสีหลอด ภาคใต้เรียกหงเทศ ภาษายาวี เรียกยาเคาะ

สบู่ดำแม้ไม่ใช่พืชเศรษฐกิจที่สำคัญในหลายประเทศ แต่ก็ยังเป็นพืชที่มีประโยชน์หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นพืชพลังงานทดแทน เนื่องจากน้ำมันสบู่ดำสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง หรือผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซลได้ นิยมปลูกเป็นแนวเขต หรือรั้วป้องกันสัตว์เลื้อยรบกวน ใช้เป็นปุ๋ยพืชสด ปลูกเพื่อป้องกันการชะล้างหน้าดิน เป็นยารักษาโรค เช่น โรคปากนกกระจอก และ โรคผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้สารสกัดจากน้ำมันของสบู่ดำยังสามารถใช้เป็นสารชีวภาพกำจัดศัตรูพืชได้อีกด้วย (Francis *et al.*, 2005)

อย่างไรก็ตาม สบู่ดำยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ผลผลิตต่ำ ผลผลิตสุกแก่ไม่พร้อมกัน ต้นสูงเกินไป ทรงพุ่มต้นใหญ่ เมล็ดมีสารพิษ และมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย (Heller, 1996) นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงตั้งวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิต เพื่อให้แข่งขันกับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ ได้ ปรับปรุงให้ผลผลิตสุกแก่พร้อมกันจะได้เก็บเกี่ยวได้ง่าย และลดความสูงต้นเพื่อให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว ลดความกว้างทรงพุ่มเพื่อให้สามารถปลูกสบู่ดำได้ในอัตราสูง ซึ่งจะส่งผลให้ผลผลิตต่อพื้นที่สูงขึ้นตามไปด้วย และลดสารพิษเพื่อให้สามารถใช้สบู่ดำเป็นอาหารสัตว์ได้ (Sujatha, 2006) วิธีการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีมาตรฐาน (conventional breeding) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induce mutation) การผสม

ข้ามชนิด (interspecific hybridization) และการถ่ายยีน (genetic transformation) เป็นต้น (Sujatha *et al.*, 2008)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สนุ่นดำเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ 3-5 เมตร แต่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสามารถสูงได้ถึง 8-10 เมตร (Heller, 1996) เป็นไม้เนื้ออ่อน มีกิ่งก้านเหนียว ลักษณะของใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวแบบสลับ (alternate) มี 5-7 lobe กว้างประมาณ 6 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15 เซนติเมตร มีใบ (cutin) เคลือบอยู่ที่ผิวใบ การจัดเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบร่างแห (palmately netted venation) มีการผลัดใบในฤดูร้อน สามารถออกดอกได้ทั้งปีในพื้นที่ที่มีความชื้นเพียงพอ มีช่อดอกแบบ panicle ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่บนช่อดอกเดียวกัน (monoecious) มีอัตราส่วนประมาณ 7 : 1 กลีบดอกของทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียมีสีเหลืองอ่อนแกมเขียว มีการผสมเกสรโดยอาศัยแมลง ผลของสนุ่นดำเป็นแบบ capsule ยาวประมาณ 2.5-3 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองสด และเมื่อปล่อยให้ผลแห้งคาต้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ ซึ่งโดยปกติจะเก็บเกี่ยวเมื่อผลเป็นสีเหลือง (Aker, 1997) เมล็ดมีสีดำ หนาประมาณ 1.2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1.8 เซนติเมตร (Putten *et al.*, 2010)

การใช้ประโยชน์จากสนุ่นดำ

ทุกส่วนของต้นสนุ่นดำสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำมันสนุ่นดำที่สกัดได้จากเมล็ด สามารถนำมาแปรรูปเป็นน้ำมันไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน ทำเทียน หรือทำสบู่ ได้ แต่ไม่สามารถใช้น้ำมันเพื่อประกอบอาหารได้ แม้ว่าน้ำมันสนุ่นดำจะมีองค์ประกอบของกรดไขมันเหมือนกับน้ำมันพืชทั่วไปที่ใช้ในการประกอบอาหารก็ตาม เนื่องจากในสนุ่นดำมีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (Ahmed and Salimon, 2009) เกษตรกรนิยมปลูกสนุ่นดำเพื่อเป็นแนวรั้วตามบ้านเรือน และแปลงปลูกพืช รวมถึงใช้เป็นยารักษาโรค (ชำนาญ และคณะ, 2549) นอกจากเป็นแหล่งน้ำมันแล้ว สนุ่นดำยังมีศักยภาพเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารสูง สำหรับสัตว์เลี้ยงแต่ต้องมีการกำจัดสารพิษบางตัวออกเสียก่อน (Makkar *et al.*, 1997)

สารพิษในสบู่ดำ

จากการรายงานของ Gubitz *et al.* (1999) พบว่า เนื้อในเมล็ดของสบู่ดำ ประกอบด้วย สารประกอบที่ขัดขวางความมีประโยชน์ของสารอาหาร (antinutritional factors) ได้แก่ trypsin inhibitor, lectin, saponin และ phytate นอกจากนี้ยังมีสาร phorbol esters ซึ่งเป็นสารพิษหลักที่พบในเมล็ด และเป็นอันตรายทั้งที่ใช้เวลาสัมผัสไม่นาน ส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติจนอาจพัฒนา กลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ (Aregheore *et al.*, 2003)

สบู่ดำเป็นพืชที่มีประโยชน์หลากหลาย เมล็ดสบู่ดำที่มีน้ำหนัก 0.75 กรัม จะมีปริมาณ โปรตีน 30-32 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 60-66 เปอร์เซ็นต์ (Liberalino *et al.*, 1988) แสดงให้เห็นว่า สบู่ดำเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง อย่างไรก็ตามตั้งแต่ปี 1987-2010 มีนักวิจัยหลายกลุ่มได้แสดงให้เห็นว่า เมล็ดหรือน้ำมันของสบู่ดำเป็นพิษต่อสัตว์ เช่น

Li *et al.* (2010) ศึกษาความเป็นพิษของสาร phorbol esters ในหนู จากการศึกษาเกี่ยวกับ อาการของอวัยวะต่าง ๆ ในหนูที่ได้รับสาร phorbol esters ที่ระดับ 21.26, 23.62, 26.24, 29.16, 32.40, และ 36.00 mg/kg ของน้ำหนักตัว พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของอวัยวะเมื่อได้รับ สาร phorbol esters ที่ระดับต่ำสุด (21.26 mg/kg ของน้ำหนักตัว) แต่พบบาดแผลเด่นชัดในปอดและ ไต มีอาการเลือดไหลไม่หยุดกระจายทั่วปอด และอาการไตวาย เมื่อได้รับสาร phorbol esters ที่ ระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 32.40 mg/kg ของน้ำหนักตัว นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อใช้สาร phorbol esters ที่ระดับสูงสุด (36.00 mg/kg ของน้ำหนักตัว) กล้ามเนื้อหัวใจและเส้นประสาทของหนูจะถูกทำลาย

Ahmed and Adam (1979a) ศึกษาผลของความเป็นพิษในเมล็ดสบู่ดำที่มีต่อลูกวัว โดยการ นำเมล็ด สบู่ดำไปบดจนละเอียดเป็นผงแป้ง แล้วผสมกับน้ำให้สัตว์กินทุกวัน ที่ระดับ 0.025, 0.25, 1 และ 2.5 g/kg ของน้ำหนักตัว ใช้ลูกวัวที่มีอายุ 6-18 เดือน ลูกวัวที่ได้รับสบู่ดำที่ระดับ 2.5 g/kg ของ น้ำหนักตัว ตายเร็วที่สุด ภายใน 4 ชั่วโมงหลังกินน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่า ระยะเวลาของการตายยัง ขึ้นอยู่กับอายุของลูกวัว โดยลูกวัวที่มีอายุน้อยจะตายเร็วกว่าลูกวัวที่มีอายุมาก ส่วนลูกวัวที่มีชีวิตอยู่ นานที่สุด คือ ลูกวัวที่ได้รับสบู่ดำที่ระดับ 0.025 g/kg ของน้ำหนักตัว สามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 14 วัน นอกจากนี้ยังพบอาการท้องร่วง หายใจหอบ ขาดน้ำ และอากาศ ในลูกวัวทุกตัวที่ได้รับสบู่ดำอีก ด้วย

Ahmed and Adam (1979b) ศึกษาผลของความเป็นพิษในเมล็ดสับดูดำที่มีต่อแกะและแพะ โดยการนำเมล็ดสับดูดำไปบดจนละเอียดเป็นผงแป้งแล้วผสมกับน้ำให้สัตว์กินทุกวัน ที่ระดับ 0.05, 0.5 และ 1 g/kg ของน้ำหนักตัว ต่อวัน พบว่า แกะและแพะมีอาการท้องร่วง ขาดน้ำ ตาพร่ามัว นอกจากนี้ยังพบอาการเลือดไหลไม่หยุดในกระเพาะ ปอด ไต และหัวใจ ซึ่งความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับระดับของสับดูดำที่สัตว์ได้รับ โดยถ้าสัตว์ได้รับสับดูดำในปริมาณมากก็จะมีอาการรุนแรง

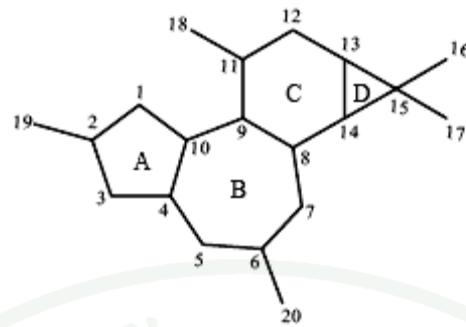
Mampane *et al.* (1987) ศึกษาการใช้สับดูดำเป็นยาในประเทศ Tswana ซึ่งอยู่ทางใต้ของทวีปแอฟริกา พบว่า มีการนำสับดูดำมาใช้เป็นยาระบายเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว แต่ในผู้ป่วยบางรายแสดงอาการรุนแรงซึ่งส่วนใหญ่เป็นเด็ก โดยอาการที่พบ คือ เวียนศีรษะ อาเจียน และปวดท้องอย่างฉับพลัน บางรายมีอาการรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์จากสับดูดำเพื่อเป็นอาหารสัตว์ แม้ว่าสับดูดำจะมีคุณค่าทางอาหารสูงก็ตาม

สารฟอร์บอลเอสเทอร์ (phorbol esters)

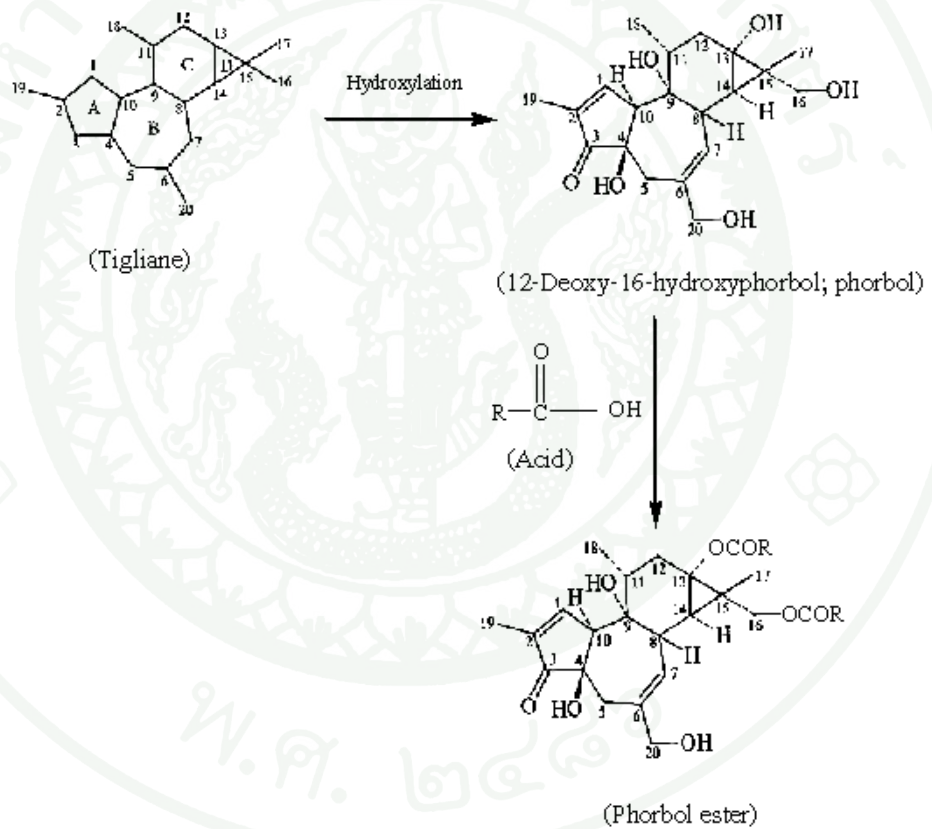
ฟอร์บอลเอสเทอร์ (phorbol esters) หรือ PEs เป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ มักพบในพืชวงศ์ Euphorbiaceae และ Thymelaeaceae เป็น ester ของ triterpene diterpenes (Gubitz *et al.*, 1999) ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 1

เนื่องจาก triterpene เป็น tetracyclic diterpene เมื่อเกิดปฏิกิริยา hydroxylation จะมีหมู่ hydroxyl (OH) เข้าจับกับสาร triterpene ที่ตำแหน่งต่าง ๆ เกิดเป็นสารประเภท alcohol และเมื่อทำปฏิกิริยา esterification กับกรดไขมันในน้ำมัน จะทำให้เกิดสารประเภท ester ที่เรียกว่า PEs แสดงดังภาพที่ 2 (Evans, 1986) ซึ่งโครงสร้างหลักของ PEs ที่พบ คือ 12-deoxy-16-hydroxyphorbol-4-[12', 14'-butadienyl]-6'-[16', 18', 20] - nonatrienyl]-bicyclo [3.1.0] hexane-(13-O)-2' [carboxylate]-(16-O)-3'-[8'-butenoic-10']ate หรือ DHPB มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 3 (Haas *et al.*, 2002)



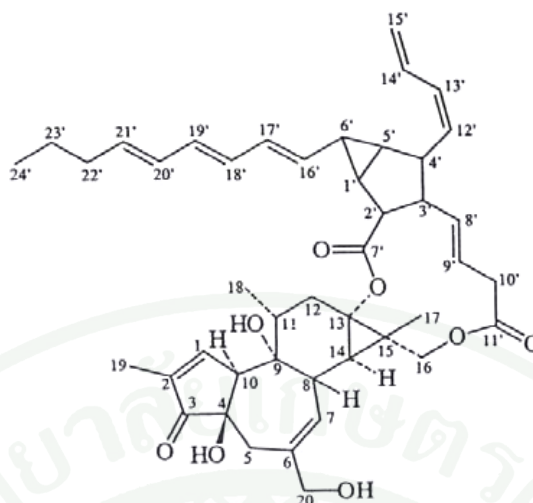
ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ tigliane

ที่มา: Gubitz *et al.*, (1999)



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาการเกิดสาร PEs

ที่มา: Evans (1986)



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของ PEs ชนิด DHPB

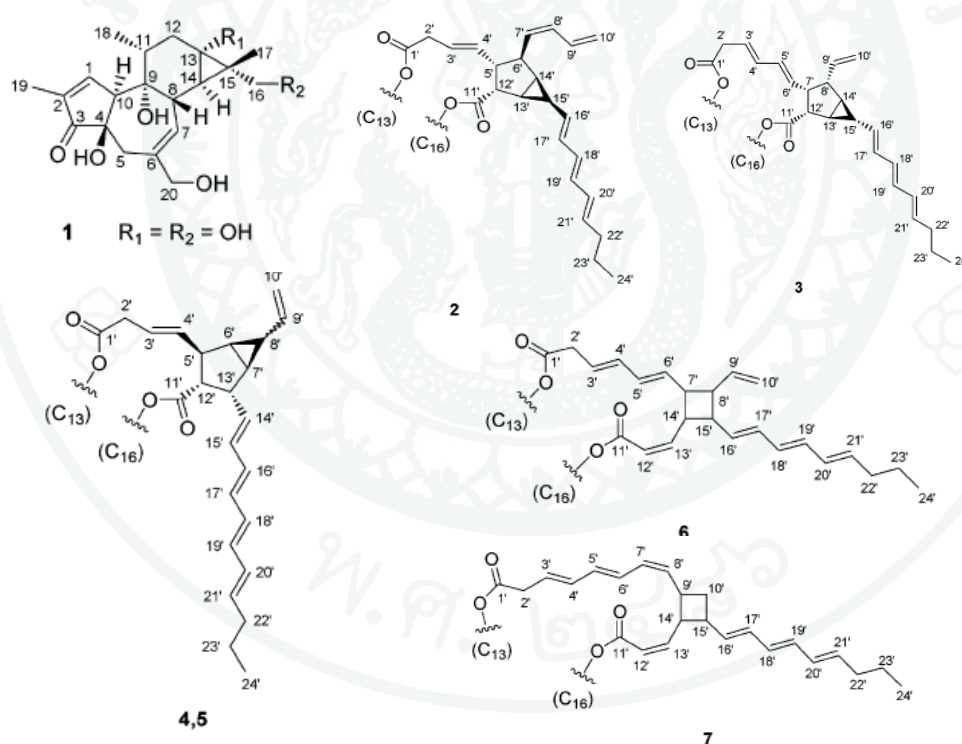
ที่มา: Haas *et al.*, (2002)

Haas *et al.* (2002) รายงานว่า ในน้ำมันสบูดำ มี PEs ประกอบอยู่ 6 ชนิด (ภาพที่ 4) ซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น 12-deoxy-16-hydroxy phorbol ester (หมายเลข 1) ส่วนสูตรโครงสร้างที่แตกต่างกันทั้ง 6 ชนิดเนื่องมาจากการมีหมู่ R_1 และ R_2 ที่แตกต่างกัน (หมายเลข 2-7) และสูตรโครงสร้างหมายเลข 4 และ 5 เป็น epimer กัน ไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยวิธีโครมาโตกราฟี จากการวิเคราะห์สาร PEs ของ Haas and Mittelbach (2000) โดยใช้ส่วนผสมของตัวทำละลาย คือ อะซิโตนไตรท์ 80% และ น้ำ 20% โดยส่วนผสมดังกล่าวจะคงที่ตลอดเวลาที่ทำการทดลอง (isocratic) พบว่า กลุ่มพีคของ PEs ขึ้นอยู่ในช่วงเวลา 6-11 นาที (ภาพที่ 5) ในการคำนวณหาปริมาณสาร PEs ที่ประกอบอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของสบูดำจะใช้ PEs ชนิด 4β , 9α , 12β , 13α , 20-pentahydroxytiglic-1, 6-dien-3-on-12 β -myristate-13acetate (TPA) เป็นสารมาตรฐานในการเทียบหาความเข้มข้น (ภาพที่ 6)

เมื่อเทียบความเข้มข้นของสาร PEs กับสารมาตรฐาน พบว่า สบูดำพันธุ์มีพิษจะมีความเข้มข้นมากกว่า 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม หรือ 0.011 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (รยากร และคณะ, 2550) ซึ่งมีพิษ และเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ส่งเสริมให้เกิดเนื้องอก (tumor promotion) การอักเสบ และการบวมของผิวหนัง (Adolf *et al.*, 1984) สารนี้มีความจำเป็นที่จะต้องกำจัดออกจากร่างกาย (detoxification) เพราะมีความเป็นไปได้ที่ผู้ใช้จะสัมผัสกับน้ำมัน ทำให้มีโอกาสได้รับสารนี้เข้าสู่ร่างกาย จากการทดลองของ Aregheore *et al.* (2003) พบว่า สามารถใช้ตัวทำละลายเอทานอลสกัด

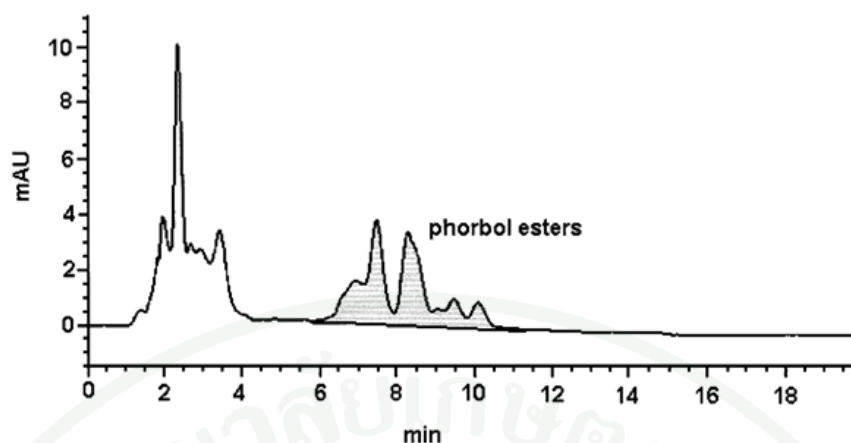
เอกสาร PEs ออกจากน้ำมันสบู่ดำได้ แต่กระบวนการในระดับที่ใหญ่ขึ้น (large scale) มีความยุ่งยากและไม่คุ้มกับการลงทุน

สาร PEs มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสบู่ดำ ในปี 1997 Makkar *et al.* ศึกษาเกี่ยวกับสบู่ดำสายพันธุ์มีพิษและไม่มีพิษ พวกเขาอธิบายว่า กากสบู่ดำมีโปรตีนสูง ให้พลังงานสูง และเส้นใยต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า กรดอะมิโนในกากสบู่ดำของสายพันธุ์มีพิษและไม่มีพิษมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณ trypsin inhibitor, lectin และ phytate แตกต่างกันแต่ไม่มากนัก ในขณะที่ปริมาณสาร PEs มีค่าที่แตกต่างกันชัดเจน โดยพบว่า ปริมาณสาร PEs ในเนื้อในเมล็ดของสายพันธุ์ไม่มีพิษ จากประเทศเม็กซิโก มีค่า 0.11 mg/g ในขณะที่สายพันธุ์มีพิษมีปริมาณสาร PEs 3.45 mg/g เพราะฉะนั้น สบู่ดำสายพันธุ์ไม่มีพิษจึงเหมาะสมที่จะเป็นแหล่งโปรตีนให้กับมนุษย์และสัตว์ได้



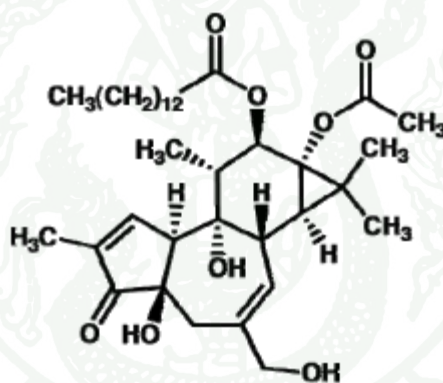
ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของ PEs ชนิดต่าง ๆ ในน้ำมันสบู่ดำ

ที่มา: Hass *et al.* (2002)



ภาพที่ 5 HPLC chromatogram ของ PEs ในน้ำมันสบู่ดำ

ที่มา: Hass and Mittelbach (2000)



ภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างของ PEs ชนิด TPA

ที่มา: Hass *et al.* (2002)

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารต่าง ๆ ออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว (distribution of partition) ของสารตัวอย่าง (solute) ระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่

(mobile phase) ซึ่งอาจเป็นแก๊ส (gas) หรือของเหลว (liquid) กับเฟสหนึ่งซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) อาจเป็นของแข็ง (solid) หรือของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุง (supporting material) ซึ่งทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่

การวิเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์ สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว แบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่นิยม ใช้มากวิธีหนึ่ง ถูกพัฒนามาจากความรู้ทางทฤษฎีของเทคนิคคอลัมน์โครมาโท กราฟี สามารถใช้ กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น การวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยามาแมลง การแพทย์ สมุนไพร และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สามารถตรวจวิเคราะห์หาสารในปริมาณต่ำ ๆ ได้ในระดับไมโครกรัม (μg) ถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกใช้เครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารที่ผสมอยู่ใน ตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารจะเกิดขึ้นระหว่าง เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และเฟส เคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสเคลื่อนที่ เป็นของเหลวที่พาสารละลายตัวอย่างไหลผ่านเฟสอยู่กับ ที่ และเป็นตัวแยกสารผสม ซึ่งเฟสอยู่กับที่จะบรรจุแน่นอยู่ในท่อ stainless ที่เรียกว่า คอลัมน์ (column) ซึ่งทำให้เกิดการแยกสารประกอบจากสารละลายตัวอย่างผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) (Husgen and Schuster, 2001)

ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC มีดังนี้ (รัตนนา, 2547)

1. ภาชนะใส่เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) เป็นที่เก็บเฟสเคลื่อนที่ เพื่อใช้เป็น ตัวพาสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ มักเป็นภาชนะที่ทำด้วยแก้วหรือสแตนเลสสตีล ที่บรรจุสารละลายได้ อย่างน้อย 500 ml นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีเครื่องกรองฝุ่นละอองหรือสิ่งสกปรกก่อนเข้าสู่ปั๊ม เนื่องจากสารละลายที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ปกติแล้วจะใช้เกรด HPLC หรือเกรดสเปกโทรสโกปี ซึ่งการเลือกใช้สารละลายต้องคำนึงถึงราคา ความหนืด ความเป็นพิษ และจุดเดือด ในทางปฏิบัติต้อง คำนึงถึง ความเสถียรของคอลัมน์ ความเหมาะสมกับดีเทกเตอร์ และสามารถละลายสารตัวอย่างได้ โดยสารละลายที่นิยมใช้กันมากคือ เฮกเซน เมทานอล เมทิลีนคลอไรด์ แอซีโทไนไตรต์ และน้ำ เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ในงาน HPLC ต้องปราศจากฟองอากาศ ซึ่งอาจเข้าไปรบกวนการทำงาน หรือทำความเสียหายให้กับปั๊มหรือดีเทกเตอร์ จึงต้องมีเครื่องกำจัดฟอง (degasser) วิธีที่สะดวกและ นิยมใช้คือ การกรองเฟสเครื่องที่ผ่านมิลลิพอร์ฟิลเตอร์ (millipore filter) ภายใต้อุณหภูมิห้อง

เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการแยกสารผสมอาจมีตัวทำละลายเพียง 1 ชนิด หรือไอโซเครติกอีลูชัน (isocratic elution) หรือมีตัวทำละลายตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปที่มีอัตราส่วนต่างกัน เรียกว่า เกรเดียนต์อีลูชัน (gradient elution) ปัจจุบันเครื่อง HPLC มีเครื่องมือสำหรับนำสารละลายที่อยู่ในภาชนะมากกว่า 2 ชนิด เข้าไปผสมกันในเครื่อง (mixing chamber) โดยอัตราส่วนของปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อเทียบกับเวลา

2. ปั๊ม (pump) เป็นตัวช่วยให้เฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งภายในบรรจุเฟสอยู่กับที่ด้วย อัตราเร็วคงที่ เนื่องจากอนุภาคของเฟสอยู่กับที่เล็กมากทำให้เกิดความต้านทานการไหล ดังนั้น เครื่องปั๊มจึงเป็นส่วนสำคัญมากที่ทำให้เกิดความดันสูง และมีอัตราการไหล 0.1-10 มิลลิลิตร/นาที

3. ระบบการฉีดสารละลายตัวอย่าง (sample injection system) ความแม่นยำในการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ขึ้นกับความถูกต้องแม่นยำของการนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ การฉีดสารละลายตัวอย่างมากเกินไป (overload column) การแยกสารจะไม่ดี ดังนั้น ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้จึงควรน้อยที่สุด

4. คอลัมน์ (column) เป็นหัวใจสำคัญของระบบโครมาโทกราฟี ส่วนมากทำด้วย สเตนเลสสตีลที่มีคุณภาพสูง บรรจุอนุภาคเฉพาะอย่าง ขึ้นกับธรรมชาติของสารตัวอย่างที่ต้องการ โดยทั่วไปมักต่อการคคอลัมน์ (guard column) เข้ากับคอลัมน์เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ เนื่องจากการคคอลัมน์จะทำหน้าที่กรองอนุภาค หรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับตัวทำละลาย

5. เครื่องตรวจวัดหรือดีเทกเตอร์ (detector) หลังจากตัวอย่างถูกแยกโดยผ่านคอลัมน์แล้ว จะผ่านดีเทกเตอร์ ซึ่งดีเทกเตอร์สำหรับ HPLC ควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

5.1 ควรมีความไวเพียงพอ ($10^{-8} - 10^{-15}$ กรัมของสารที่วิเคราะห์ต่อวินาที)

5.2 สัญญาณตอบรับมีความถูกต้องแม่นยำและไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และอุณหภูมิ

5.3 เชื้อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน

5.4 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับควรเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงกว้าง

5.5 ไม่ทำลายสารตัวอย่าง

5.6 เซลล์ของดีเทกเตอร์ควรมีปริมาตรภายในน้อย ๆ เพื่อลดปัญหาการเกิดเบนดักกว้าง

Xenia effect

xenia effect เป็นปรากฏการณ์ที่พันธุกรรมของเชื้อสปีพันธุ์เพศผู้ แสดงลักษณะออกมาในเนื้อเยื่อของต้นแม่ ก่อนที่จะไปแสดงออกในรุ่นลูก xenia effect ทำให้เกิดความแตกต่างในขนาด รูปร่าง สี ระยะเวลาในการพัฒนากลายเป็นผล และองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดและผล ซึ่งเกิดจากการปฏิสนธิจากละอองเกสรเพศผู้ที่แตกต่างกัน (Denney, 1992)

นอกจากนี้ ในปี 1992 Denney ยังรายงานว่า xenia มี 2 รูปแบบ ได้แก่ xenoplasms ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบผลรวมถึงขนาดของรูปร่างอันเนื่องมาจากการผสมจากละอองเกสรเพศผู้ และ xenochromes เช่น การเปลี่ยนแปลงของสีผล รูปร่าง ขนาดของผล และส่วนต่าง ๆ ของผล อย่างไรก็ตาม ในหลายปีที่ผ่านมา มีผู้ตรวจสอบพบว่า ลักษณะความหวาน หรือปริมาณน้ำตาล ระยะเวลาในการสุกแก่ องค์ประกอบเคมีภายในผล และเมล็ด ปริมาณน้ำมัน กรดอะมิโน โปรตีน ก็เป็นลักษณะที่อาจเป็นผลมาจาก xenia effect ได้เช่นกัน

ผลจาก xenia จะทำให้สามารถติดตามพันธุกรรมเหล่านั้นได้ในทุก ๆ รุ่นที่มีการผสมพันธุ์ ไม่ว่าลักษณะนั้น ๆ เป็นลักษณะข่มหรือลักษณะแฝง ตัวอย่างที่ชัดเจน ได้แก่ ลักษณะการแสดงออกของเอ็นโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวโพด โดยถ้านำข้าวโพดหวานผสมกับข้าวโพดไร่ ลักษณะของลูก F_1 จะแสดงออกเป็นเมล็ดข้าวโพดไร่ นั่นคือ ลักษณะข่มของยีนแต่ละตัว เมื่ออยู่ด้วยกันครบทุกตัว จะแสดงลักษณะของข้าวโพดไร่ ในกรณีต้องการผสมข้ามระหว่าง ข้าวโพดไร่กับข้าวโพดหวาน เพื่อนำลักษณะที่ดีในข้าวโพดไร่เข้าสู่ข้าวโพดหวาน xenia effect จะช่วยให้การคัดเลือกพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพราะสามารถทราบได้ว่าเมล็ดใดได้รับการผสมพันธุ์ (กฤษฎา, 2552)

นอกจากนี้ xenia effect ยังทำให้เข้าใจสรีรวิทยาและพันธุกรรมของพืช ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์และการผลิตพืชอีกด้วย

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบลูกผสม

ความหมายทั่วไปของคำว่า เครื่องหมาย คือ สิ่งที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่ง 2 สิ่ง ซึ่งสามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล เป็นสิ่งที่บอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (อรรถน์, 2548)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เป็นที่มาของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ในระดับสัณฐานวิทยา (morphological marker) ระดับชีวเคมี (biochemical marker) และระดับโมเลกุล (molecular marker) ได้แก่

1. morphological marker เป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นได้ทันที ซึ่งก็คือลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายชนิดนี้จัดเป็นเครื่องหมายที่มีความต้องการมากในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะถ้าเครื่องหมายดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ผลผลิต หรือต้านทานต่อโรคและแมลง จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ และข้อได้เปรียบของเครื่องหมายชนิดนี้ คือ ไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการใดมาตรวจสอบ เพราะสามารถมองเห็นได้ด้วยตาอยู่แล้ว แต่ข้อจำกัดของเครื่องหมายชนิดนี้คือ การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานมักได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่น ความสูง ผลผลิต หรือสีดอก อาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดินหรือปุ๋ย

2. biochemical marker เป็นเครื่องหมายที่ถูกสร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ การศึกษาเอนไซม์ เป็นวิธีที่ค่อนข้างง่ายและจัดว่าไม่แพง แต่มีข้อจำกัดที่การแสดงออกของเอนไซม์ได้รับผลกระทบโดยตรงจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม และระยะการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกับ morphological marker นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะเจาะจงต่ำ เนื่องจากเมื่อยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย อาจมีผลทำให้ชนิดของกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะไม่สามารถตรวจสอบได้

3. molecular marker เป็นเครื่องหมายที่ถูกสร้างขึ้นมาจากชิ้นส่วนของ DNA ดังนั้นเครื่องหมายชนิดนี้จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า DNA marker การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์

จากตัวอย่างที่ถูกเก็บได้ไว้เป็นเวลานานและดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใด ๆ ของระยะการเจริญเติบโตหรือทางสรีรวิทยาใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้

การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) นอกจากจะใช้เพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอส่วนต่างๆ ในจีโนมหรือการทำแผนที่ของยีนแล้ว ยังสามารถตรวจสอบความหลากหลาย (polymorphism) ของพันธุ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ ตรวจสอบพันธุ์พ่อแม่และทดสอบลูกผสม ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต หาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ตรวจสอบหรือบ่งชี้ลักษณะจำเพาะ เช่น ความต้านทานโรค ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมบางอย่างซึ่งจะนำไปสู่การโคลนยีนโดยอาศัยแผนที่ (map-base cloning) ได้ด้วย (สุรินทร์, 2552)

Simple Sequence Repeat; SSR

Simple Sequence Repeat; SSR หรือ ไมโครแซทเทลไลต์ เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อาศัยหลักการซ้ำกันของชุดเบส (repetitive sequence) ที่เรียงต่อกันในทิศทางเดียวกันตลอด (tandemly repeat) ส่วนมากประกอบด้วยดีเอ็นเอที่มีขนาดของชุดซ้ำสั้นมากประมาณ 1-6 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส ส่วนใหญ่จะเป็นชุดซ้ำ 2 คู่เบส (dinucleotide) แต่บางครั้งก็อาจพบชุดซ้ำที่เป็น (trinucleotide) ถึง 4 (tetranucleotide) คู่เบสก็ได้ ซึ่งพบได้น้อยกว่า (Chen *et al.*, 2002) เทคนิค SSR นั้นมีประโยชน์หลายประการ เช่น การศึกษาด้านจีโนม การสร้างแผนที่จีโนม เป็นต้น ทั้งนี้เพราะ SSR มีอยู่เป็นจำนวนมากกระจายทั่วไปในจีโนม และมีความแปรปรวนมาก อีกทั้งจำนวนซ้ำของ SSR มีความแตกต่างกันในพืชหรือสัตว์ต่างสายพันธุ์ในชนิด (species) เดียวกัน จึงสามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายได้เป็นอย่างดีในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสาเหตุที่เกิดความแปรปรวนของจำนวนซ้ำใน SSR มาจากการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) และบริเวณ slippage ทำให้จำนวนซ้ำของหน่วยดีเอ็นเอที่ได้ภายหลังการจำลองตัวเอง มีมากขึ้นหรือน้อยลง (addition or deletion) SSR จัดว่าเป็น semispecific primer ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากขึ้น ผลที่ได้จากการใช้ SSR จะเห็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มีหลายแถบเช่นเดียวกับ RAPD แต่สามารถบอกความแตกต่างของ heterozygous และ homozygous นอกจากนี้ยังสามารถทำซ้ำ (reproducibility) ได้ดีอีกด้วย (อรรธน์, 2548)

การตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์มีข้อดี คือ ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจะพบอยู่ทั่วไปในจีโนม การแสดงลักษณะของแถบดีเอ็นเอเป็นแบบโคโดมิแนนท์ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมหรือโพลิมอร์ฟิซึมสูง มีจำนวนอัลลีลมาก และมีระดับเฮเทอโรไซโกซิตีสูง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องอัตโนมัติ (Schlotterer, 2001)

ดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบแม้ว่าจะมีปริมาณน้อย คุณภาพไม่ดีหรือมีการเสียหายไปบางส่วน ก็สามารถวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมีขนาดเพียง 100-300 เบสเพอร์ (bp) เท่านั้น ข้อดีอีกประการหนึ่งของการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ คือ สามารถจำแนกอัลลีลในแต่ละโลกัสได้ ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานของพันธุศาสตร์ประชากร เช่น ความถี่ของอัลลีล สำหรับข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ ทำให้ต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาในสับดำ

Tanya *et al.* (2011a) พัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสับดำสายพันธุ์มีพิษและไม่มีพิษ จำนวน 36 สายพันธุ์ ซึ่งมีแหล่งที่มาแตกต่างกัน ได้แก่ สายพันธุ์จากเม็กซิโก 26 สายพันธุ์, จีน 3 สายพันธุ์, ไทย 3 สายพันธุ์ และเวียดนาม 4 สายพันธุ์ โดยเครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 49 เครื่องหมาย ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้ฐานข้อมูล NCBI พบว่า 25 เครื่องหมาย สามารถเข้าจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยที่ 17 เครื่องหมาย ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทั้งสองกลุ่มได้ ในขณะที่อีก 8 เครื่องหมาย สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทั้งสองกลุ่มได้ ซึ่งเครื่องหมายที่ถูกพัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับดำ และอาจจะนำไปใช้ในการจำแนกสายพันธุ์มีพิษและไม่มีพิษออกจากกันได้

Pamidiamarri *et al.* (2008) ศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างระหว่างสับดำสายพันธุ์มีพิษและไม่มีพิษ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD จำนวน 371 และเครื่องหมายโมเลกุล AFLP จำนวน 1441 เครื่องหมาย พบว่า ทั้งเครื่องหมายโมเลกุล RAPD และ AFLP สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ทั้งสองกลุ่มได้ โดยสามารถแยกความแตกต่างได้ 56 เครื่องหมาย ซึ่งคิดเป็น 15.09 เปอร์เซ็นต์ และ 238 เครื่องหมาย คิดเป็น 16.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองแบบมีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทั้งสองกลุ่มได้ใกล้เคียงกัน

Basha *et al.* (2009) ศึกษาพันธุกรรมของสบู่ดำ 72 สายพันธุ์ จาก 13 ประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD และ ISSR และลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ ปริมาณน้ำมัน ปริมาณโปรตีน ในเนื้อในเมล็ด และปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล RAPD สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างได้ 61.8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล ISSR สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างได้ 35.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองชนิดไปจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มสบู่ดำจากเม็กซิโกซึ่งมีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ต่ำออกจากพันธุ์อื่น ๆ นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเครื่องหมาย SCARs เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการคัดเลือก (marker assisted selection)

Phumichai *et al.* (2011) ใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 55 เครื่องหมาย ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์สบู่ดำในประเทศไทยจำนวน 18 สายพันธุ์, 8 สายพันธุ์จากเม็กซิโก, เจมปัตตาเวีย, สบู่แดง และหนุมนนังแท่น ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกับสบู่ดำ อย่างละ 1 สายพันธุ์ พบว่า 11 เครื่องหมาย สามารถให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์สบู่ดำ คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ และ 34 เครื่องหมายหรือ 62 เปอร์เซ็นต์ ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์สบู่ดำกับพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกัน

Wen *et al.* (2010) พัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR และ SSR เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสบู่ดำจำนวน 45 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 419 เครื่องหมาย SSR จำนวน 182 เครื่องหมาย จากมันสำปะหลัง พบเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์จำนวน 187 และ 54 เครื่องหมาย ตามลำดับ และจากการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมพบว่าสามารถแยกสายพันธุ์สบู่ดำออกเป็น 6 กลุ่ม ตามจีโนไทป์และสถานที่ปลูก

Sun *et al.* (2008) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศจีนจำนวน 58 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 17 เครื่องหมาย และ AFLP จำนวน 7 คู่ พบว่าเครื่องหมาย SSR 1 เครื่องหมาย และ AFLP 70 ตำแหน่ง สามารถแยกความแตกต่างของสบู่ดำได้ และเมื่อนำไปจัดกลุ่มทางพันธุกรรมพบว่าทุกตัวอย่างมีความเหมือนกันทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์สับดำ

- 1.1 สายพันธุ์ไทย ได้แก่ ชัยนาท โคราซ แพร์ และ KUBP
- 1.2 สายพันธุ์ต่างประเทศ ได้แก่ เม็กซิโก เวียดนาม อินเดีย และพม่า

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผสมพันธุ์สับดำ

- 2.1 ถังคลุมช่อดอก
- 2.2 ปากคีบ
- 2.3 ลวดอ่อน
- 2.4 plate สำหรับใส่ดอกตัวผู้
- 2.5 70% ethanol
- 2.6 ป้ายชื่อ

3. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

- 3.1 ตู้อบ
- 3.2 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง
- 3.3 เครื่องบดตัวอย่าง
- 3.4 โถดูดความชื้น
- 3.5 กระดาษกรอง (Whatman No.1)

4. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารฟอรับอลเอสเทอร์ (PEs)

4.1 วัสดุอุปกรณ์

- 4.1.1 thimble

4.1.2 water cooling

4.1.3 soxhlet apparatus (Buchi Universal Extraction System B-811)

4.1.4 rotary evaporator (Buchi Rotavapor[®] R-205)

4.1.5 volumetric flask ขนาด 25 ml

4.1.6 ไมโครปิเปต

4.1.7 ขวดสีชา

4.1.8 พาราฟิล์ม

4.2 สารเคมี

4.2.1 methanol (HPLC grade)

4.2.2 methanol (analytical grade)

5. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร PEs

5.1 วัสดุอุปกรณ์

5.1.1 syringe แก้ว

5.1.2 HPLC syringe filter

5.1.3 vial ขนาด 2 ml

5.1.4 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น 600E

Waters

5.2 สารเคมี

5.2.1 สาร standard TPA, Sigma

5.2.2 acetonitrile (HPLC grade)

5.2.3 H₂O (HPLC grade)

5.2.4 methanol (HPLC grade)

6. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมสุนัขดำ

6.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด ตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

6.1.1 ไข่อ่อนสุนัขดำ

6.1.2 โกร่ง

6.1.3 ไนโตรเจนเหลว

6.1.4 หลอด ขนาด 1.5 ml

6.1.5 ไมโครปีเปต

6.1.6 water bath

6.1.7 centrifuge

6.1.8 เครื่อง Nanodrop spectrophotometer รุ่น Nanodrop 8000 (Nanodrop technologies, DE, USA)

6.1.9 ชุด agarose gel electrophoresis

6.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด ตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

6.2.1 liquid nitrogen

6.2.2 extraction buffer (2% CTAB, PVP, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 2% mercaptoethanol)

6.2.3 chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1

6.2.4 5M NaCl

6.2.5 isopropanol

6.2.6 70% ethyl alcohol

6.2.7 TE buffer (10 mM Tris HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0))

6.2.8 1 mg/ml Rnase

6.2.9 agarose

6.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction; PCR)

6.3.1 PCR plate

6.3.2 ไมโครปิเปต

6.3.3 เครื่อง thermal cycle

6.3.4 ชุด polyacrylamide gel electrophoresis

6.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

6.4.1 genomic DNA ของสุนัขดำ

6.4.2 0.2 mM dNTPS

6.4.3 1X *Taq* buffer

6.4.4 2 mM $MgCl_2$

6.4.5 1u *Taq* polymerase

6.4.6 0.5 uM SSR primer

6.4.7 น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

6.4.8 polyacrylamide

วิธีการ

1. การหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ (PEs) ในเมล็ดสบู่ดำ

1.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (CRD) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 determination มี 4 ปัจจัย คือ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร (ปัจจัย S) ประกอบด้วย ตัวทำละลาย methanol (HPLC grade) และ methanol (analytical grade), น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดสาร (ปัจจัย W) ประกอบด้วย น้ำหนัก 4, 5 และ 6 กรัม สายพันธุ์ของสบู่ดำ (ปัจจัย V) ประกอบด้วย สายพันธุ์ชัชนาท (CN) โคราซ (K) อินเดีย (ID) KUBP พม่า 1 (MM1) พม่า 2 (MM2) เวียดนาม (V) เม็กซิโก 6 (M6) เม็กซิโก 85 (M85) และเม็กซิโก 87 (M87) และส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดสบู่ดำ (ปัจจัย P) ประกอบด้วย เนื้อในเมล็ด (kernel) เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) และทั้งเมล็ด (whole seed)

1.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อสกัดสาร PEs ในน้ำมันสบู่ดำ

เก็บผลสบู่ดำที่สุกแก่จากแปลง จากนั้นแบ่งเมล็ดสบู่ดำออกเป็นเนื้อในเมล็ด (kernel) เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) และทั้งเมล็ด (whole seed) ซึ่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 90 °C นาน 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ซึ่งน้ำหนักหลังอบแล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง

1.3 การสกัดสาร PEs ในน้ำมันสบู่ดำ

สกัดด้วยเครื่อง soxhlet apparatus ดัดแปลงตามวิธีของ Haas and Mittelbach (2000) โดยนำตัวอย่างที่บดละเอียดมาอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 4 ชั่วโมง ซึ่งตัวอย่างให้มือน้ำหนัก 3 ระดับ คือ 4, 5 และ 6 กรัม ใช้ตัวทำละลาย 2 แบบ คือ ตัวทำละลาย methanol (HPLC grade) และ methanol (analytical grade) ใช้เวลาสกัดประมาณ 4 ชั่วโมง นำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 °C ความดัน 250-300 บาร์ จนได้ของเหลวเหนียวข้น ปรับปริมาตรโดยใช้ methanol (HPLC grade) ปริมาตร 25 ml จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร PEs ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป

1.4 การวิเคราะห์สาร PEs ในน้ำมันสุญุดำ

วิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC รุ่น 600E ของบริษัท Waters คัดแปลงตามวิธีของ Haas and Mittelbach (2000) โดยใช้สารมาตรฐาน 4 β , 9 α , 12 β , 13 α , 20-pentahydroxytiglic-1, 6-dien-3-on-12 β -myristate-13 acetate (TPA) จากบริษัทซิกมา (Sigma) และสารเคมีจากบริษัทเมอร์ก (Merk) ปริมาตรสารสกัด PEs ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ 20 μ l กรองด้วยไนลอนเมมเบรน (syringe filter) ขนาด 0.2 μ m ใช้ photodiode array เป็น detector ที่ 280 nm คอลัมน์ที่ใช้เป็น Symmetry C18 column ขนาด 3.9 x 150 mm ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ คือ acetonitrile (HPLC grade) และ น้ำ (HPLC grade) ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1 ml/min

1.5 การสร้าง calibration curve ของสารมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน TPA ในเมทานอล HPLC grade ให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm จากนั้นทำการวิเคราะห์ตามข้อ 1.4 พื้นที่ใต้พีคและปริมาณสาร PEs จะถูก พล็อตบนแกน Y และ X ตามลำดับ จากนั้นจะได้สมการเส้นตรงซึ่งลากผ่านจุดต่าง ๆ โดยสมการที่ได้จากการสร้าง calibration curve จะใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร PEs

1.6 การคำนวณปริมาณสาร PEs

ใช้พื้นที่ใต้พีคโครมาโตแกรม เปรียบเทียบกับสมการที่ได้จากการทำ calibration curve ของสารมาตรฐาน TPA ($Y = 1760X - 5690$) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.6.1 คำนวณหาความเข้มข้นของ PEs (หน่วยเป็น ppm) โดยแทนค่าตัวแปร Y ในสมการมาตรฐาน ด้วยพื้นที่ใต้พีค

1.6.2 คำนวณความเข้มข้นของ PEs (หน่วยเป็น mg) โดยนำความเข้มข้น (หน่วยเป็น ppm) ที่ได้จากข้อ 1.6.1 มาคูณด้วย 25 แล้วหารด้วย 1000

1.6.3 คำนวณความเข้มข้นของ PEs (หน่วยเป็น mg/g) โดยนำความเข้มข้น (หน่วยเป็น mg) ที่ได้จากข้อ 1.6.2 มาหารด้วยน้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด (หน่วยเป็น g)

1.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

ใช้โปรแกรม Microsoft excel ร่วมกับ R program (R Development Core Team, 2010) และตรวจสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแบบ DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 และ 0.01

2. การศึกษา xenia effect ของลักษณะปริมาณสาร PEs

2.1 การสร้างลูกผสม F_1

คัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ที่จะใช้ในการสร้างลูกผสมโดยใช้ข้อมูลปริมาณสาร PEs ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์สับปะรดของภาควิชาพืชไร่นา เลือกต้นที่มีปริมาณสาร PEs สูง (สายพันธุ์ชัยนาท แพร่ และโคราช) และต่ำ (สายพันธุ์เม็กซิโก) เป็นพ่อและแม่พันธุ์ตามลำดับ ซึ่งขั้นตอนการผสมเริ่มจากใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์เพื่อถอนดอกตัวผู้ ออกในตอนเย็น โดยเลือกช่อดอกที่คาดว่าดอกตัวเมียจะบานในตอนเช้าของวันรุ่งขึ้น สังเกตได้จาก ดอกตัวเมียจะมีขนาดใหญ่ และเต่งพองประมาณ ดิดย้ายช่อ ระบุชื่อพันธุ์ที่ใช้เป็นแม่ และวันที่ทำการ ถอนดอกตัวผู้ ออก เช้าวันรุ่งขึ้น เก็บดอกตัวผู้ใส่ภาชนะ ใช้ปากคีบคีบดอกตัวผู้แล้วป้าย pollen ลงบน stigma ของดอกตัวเมียที่บาน ใช้สวมนัดถุงคลุมช่อดอกให้มีมิติเพื่อป้องกันการผสมจาก pollen ด้าน นอก เขียนป้ายชื่อระบุพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อ และวันที่ทำการผสม นอกจากนี้ยังนำสายพันธุ์พ่อและแม่ ผสมตัวเอง โดยนำถุงคลุมช่อดอกมาคลุมช่อดอกที่ยังไม่บานของพ่อและแม่พันธุ์ที่คัดเลือกไว้ เพื่อนำ เมล็ดผสมตัวเองของพ่อ (P_1) และแม่พันธุ์ (P_2) ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร PEs เปรียบเทียบกับลูกผสม เมื่อได้เมล็ดลูกผสม F_1 แล้ว แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร PEs เพื่อ ศึกษา xenia effect โดยทำตามขั้นตอนข้อ 1.2-1.4 อีกส่วนหนึ่งนำไปเพาะในถาดเพาะชำ แล้วย้ายลง ปลูกลงแปลงเมื่ออายุ 3 เดือน เพื่อใช้ในการสร้างลูกผสมรุ่น F_2 ต่อไป

2.2 การตรวจสอบความเป็นลูกผสม

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำไปอ่อนของสับค้ำมาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Tanya *et al.* (2011b) โดยบดตัวอย่างใบอ่อนจนละเอียดเป็นผงแป้งด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml ที่มี extraction buffer ปริมาตร 700 μ l บรรจุอยู่ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 45 นาที เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม isopropanol ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่า และ 5M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 3-4 ชั่วโมง หรือข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำความสะอาดตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง โดยเติม 70% ethyl alcohol ปริมาตร 700 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนใน TE buffer ปริมาตร 40 μ l เติม RNaseA 10 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการทำ electrophoresis ใน agarose gel ความเข้มข้น 0.8% จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบร-ไมด์ แล้วตรวจสอบผลภายใต้แสง uv วัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer Nanodrop 8000 (Nanodrop technologies, DE, USA) แล้วเจือจางดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้น 5 ng/ μ l เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2.2.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)

ตรวจสอบความเป็นลูกผสมสับค้ำด้วยเครื่องหมายโมกุลชนิด simple sequence repeat (SSR) จำนวน 2 เครื่องหมาย (MPN 6 และ 7) จากการรายงานของ Tanya *et al.* (2011a) โดยนำ genomic DNA ของลูกผสมสับค้ำ F₁ มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ DNA template 5 ng, 0.2 mM dNTPS, 1X Taq buffer, 2mM MgCl₂, 0.5uM SSR primer 1 ยูนิต และ Taq DNA polymerase ปริมาตรรวม 10 μ l นำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (thermal cycler) GeneAmp® PCR System 9700 thermocycler (AppliedBiosystems) ซึ่งใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ อุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที 1 รอบ

อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing 56-57 °C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที 35 รอบทำปฏิกิริยา และอุณหภูมิ 72 °C นาน 10 นาที 1 รอบ

2.2.3 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ผสมกับ loading dye (10 mM EDTA, 98% formamide, 0.02% (w/v) bromophenol blue, 0.02% (w/v) xylene-cyanol) อัตราส่วน 10: 2 μ l ตามลำดับ จากนั้นนำไปแยกความแตกต่างของ ดีเอ็นเอใน 5% โพลีอะครีลาไมด์ เจล ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver-staining solution บันทึกการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมต่อไป

2.3 การทดสอบ xenia effect

ใช้ข้อมูลปริมาณสาร PEs ของลูกผสม F_1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยที่หากใช้ พ่อพันธุ์ที่มีปริมาณสาร PEs สูง และแม่พันธุ์มีปริมาณสาร PEs ต่ำ แล้วลูกผสม F_1 มีปริมาณสาร PEs ต่ำ แสดงว่า ไม่มี xenia effect ควบคุมลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสับดูในทางกลับกัน ถ้า เมล็ด F_1 มีปริมาณสาร PEs สูง แสดงว่า มี xenia effect ควบคุมลักษณะดังกล่าว แสดงดังตารางที่ 1 กล่าวคือ ปริมาณสาร PEs จะมีแนวโน้มไปทางแม่พันธุ์ ถ้าลักษณะปริมาณสาร PEs ไม่มี xenia effect

ตารางที่ 1 อิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้บนต้นแม่

Crosses	PEs content		Xenia effect	
	Maternal	Paternal	Yes	No
1	High	Low	Low	High
2	Low	High	High	Low

3. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสับปะรด

3.1 การสร้างลูกผสม

สร้างลูกผสมตรงและลูกผสมกลับ โดยใช้สายพันธุ์ชันนาท เป็นสายพันธุ์พ่อ และสายพันธุ์เม็กซิโกเป็นสายพันธุ์แม่ ในการสร้างลูกผสมตรง และใช้สายพันธุ์เม็กซิโกเป็นสายพันธุ์พ่อสายพันธุ์ชันนาท เป็นสายพันธุ์แม่ เมื่อได้เมล็ดลูกผสมนำไปเพาะในถาดเพาะชำ แล้วย้ายลงปลูกในแปลงเมื่ออายุ 3 เดือน จากนั้นทำการสร้างลูกผสมรุ่น F_2 โดยผสมตัวเองสับปะรดรุ่น F_1

3.2 การวิเคราะห์สาร PEs

เก็บเมล็ด F_2 แบบแยกต้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร PEs โดยทำตามขั้นตอนข้อ 1.2-1.4 และคำนวณปริมาณสารตามขั้นตอนในข้อ 1.5

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.3.1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย 2 กลุ่ม

ทำได้โดยคำนวณค่าสถิติที (t-test) ดังนี้ (ชูศักดิ์, 2551)

$$t = \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

โดยที่
$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

3.3.2 การแจกแจงความถี่

ทำได้โดยคำนวณหาจำนวนชั้น จำนวนข้อมูลที่จะจัดเข้าสู่ชั้น จำนวนข้อมูลในแต่ละชั้น (อันตรภาค) เขียนขีดจำกัดบนและล่างของแต่ละชั้น แล้วพิจารณาแต่ละจำนวนว่าอยู่ในชั้น

ใด โดยทำรอยขีดของแต่ละชั้น แล้วนับจำนวนรอยขีดซึ่งจะเป็นจำนวนความถี่ของข้อมูลในชั้นนั้น ๆ (กัลยา, 2550)

$$\text{จำนวนชั้น (k)} = 1 + 3.322 \log N$$

เมื่อ N คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

$$\text{ค่าพิสัย} = \text{ค่าสูงสุด} - \text{ค่าต่ำสุด}$$

$$\text{จำนวนข้อมูลที่จะจัดเข้าสู่ชั้น} = \text{ค่าพิสัย} + 1$$

$$\text{อัตราภาคชั้น} = \frac{\text{ค่าพิสัย}}{\text{จำนวนชั้น}}$$

3.4 การคำนวณการกระจายตัวของข้อมูลโดยพิจารณาจากควอไทล์ ตามวิธีของ Bowley

ค่าทางสถิติที่ต้องคำนวณ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ความโด่ง (kurtosis) และความเบ้ (skewness)

การคำนวณหาค่าความเบ้เป็นการพิจารณาว่า โค้งความถี่ของข้อมูลนั้นมีการแจกแจงที่สมมาตร เบ้ซ้าย หรือเบ้ขวา โดยจะเป็นการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความเบ้ ซึ่งมีวิธีต่าง ๆ ดังนี้ (กัลยา, 2550)

1. พิจารณาจากความสัมพันธ์ของค่ากลางเลขคณิต (mean) มัชยฐาน (median) ฐานนิยม (mode) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) โดยวิธีของ Karl Pearson จากสูตร

$$\frac{\text{mean} - \text{mode}}{\text{SD}} \quad \text{หรือ} \quad \frac{3(\text{mean} - \text{median})}{\text{SD}}$$

2. พิจารณาจากควอไทล์ โดยวิธีของ Bowley จากสูตร

$$\frac{(Q_3 - Q_2) - (Q_2 - Q_1)}{Q_3 - Q_1}$$

โดย Q_1 คือ ควอไทล์ที่ 1

Q_2 คือ ควอไทล์ที่ 2

Q_3 คือ ควอไทล์ที่ 3

3. พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ไทล์ จากสูตร

$$\frac{(P_{90} - P_{50}) - (P_{50} - P_{10})}{P_{90} - P_{10}}$$

โดย P_{10} คือ เปอร์เซนต์ไทล์ที่ 10

P_{50} คือ เปอร์เซนต์ไทล์ที่ 50

P_{90} คือ เปอร์เซนต์ไทล์ที่ 90

เมื่อคำนวณได้ค่าของสัมประสิทธิ์ความเบ้แล้ว ก็พิจารณาความเบ้ของโค้งความถี่ ดังนี้

ถ้าสัมประสิทธิ์ความเบ้ = 0 โค้งความถี่มีการแจกแจงที่สมมาตร

สัมประสิทธิ์ความเบ้ > 0 โค้งความถี่มีการแจกแจงที่เบ้ขวา

สัมประสิทธิ์ความเบ้ < 0 โค้งความถี่มีการแจกแจงที่เบ้ซ้าย

คำนวณหาค่าความโค้ง เพื่อพิจารณาว่า โค้งความถี่ของข้อมูลมีการแจกแจงที่โค้งปกติ โค้งมาก หรือโค้งน้อย โดยจะเป็นการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความโค้ง ซึ่งมีวิธีการคำนวณ ดังนี้ (กัลยา, 2550)

$$\text{สัมประสิทธิ์ความโค้ง} = \frac{QD}{P_{90} - P_{10}}$$

$$\text{โดย } QD \text{ คือ ส่วนเบี่ยงเบนควอไทล์} = \frac{(Q_3 - Q_1)}{2}$$

เมื่อกำหนดได้ค่าสัมประสิทธิ์ความโค้งแล้ว ก็พิจารณาความโค้งของโค้งความถี่ ดังนี้

ถ้าสัมประสิทธิ์ความโค้ง = 0.263 โค้งความถี่ที่มีการแจกแจงที่โค้งปกติ

สัมประสิทธิ์ความโค้ง > 0.263 โค้งความถี่ที่มีการแจกแจงที่โค้งมาก

สัมประสิทธิ์ความโค้ง < 0.263 โค้งความถี่ที่มีการแจกแจงที่โค้งน้อย

สถานที่ในการทดลอง

1. พื้นที่แปลงทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
3. ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ธาตุอาหารสัตว์ สถาบันสุวรรณวาลกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์ และผลิตภัณฑ์สัตว์ (สวพป.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

ตั้งแต่ เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2554

ผลและวิจารณ์

1. การหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ (PEs) ในน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดสบู่ดำ

การวิเคราะห์ปริมาณสาร PEs ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ส่วนผสมของตัวทำละลาย คือ อะซิโตนไตรท์ 80% และ น้ำ 20% ซึ่งส่วนผสมดังกล่าวจะคงที่ตลอดเวลาทำการทดลอง (isocratic) ตามวิธีการวิเคราะห์ ของ Haas and Mittelbach (2000) พบรูปแบบของพีค PEs 2 แบบ แสดงดังภาพที่ 7 และ 8 โดยรูปแบบพีคที่พบดังภาพที่ 7 พบในส่วนที่มีปริมาณสาร PEs สูง ซึ่งได้แก่ น้ำมันที่สกัดจากเมล็ดและเนื้อในเมล็ดของ สบู่ดำสายพันธุ์ที่มีสาร PEs สูง ลักษณะพีคที่พบเป็นห้าพีคย่อยติดกัน สอดคล้องกับการรายงานของ Nokkaew (2008) ในขณะที่รูปแบบพีคที่พบดังภาพที่ 8 พบในส่วนที่มีปริมาณสาร PEs ต่ำ ได้แก น้ำมันที่สกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดของสบู่ดำสายพันธุ์ที่มีสาร PEs สูง น้ำมันที่สกัดจากเมล็ด เนื้อในเมล็ด และเปลือกหุ้มเมล็ด ของสบู่ดำสายพันธุ์ที่มีสาร PEs ต่ำ ลักษณะพีคของสาร PEs ที่พบมีเพียง 2 พีค ที่สามารถตรวจพบได้ โดยพีคของสาร PEs จะปรากฏที่ retention time 8-12 นาที สอดคล้องกับการรายงานของ Wink *et al.* (1997) ในขณะที่ Haas and Mittelbach (2000) รายงานว่า พีคของสาร PEs ปรากฏที่ retention time 6-11 นาที ภายใต้อาการวิเคราะห์เดียวกัน ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า retention time ของสาร PEs ที่ปรากฏในการทดลองนี้มีช่วงคาบเกี่ยวกับการรายงานของ Haas and Mittelbach (2000) ขณะที่การทำการกราฟมาตรฐาน TPA ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm พบว่า พีคของสารมาตรฐาน ปรากฏที่ retention time 20-22 นาที แสดงดังภาพที่ 9

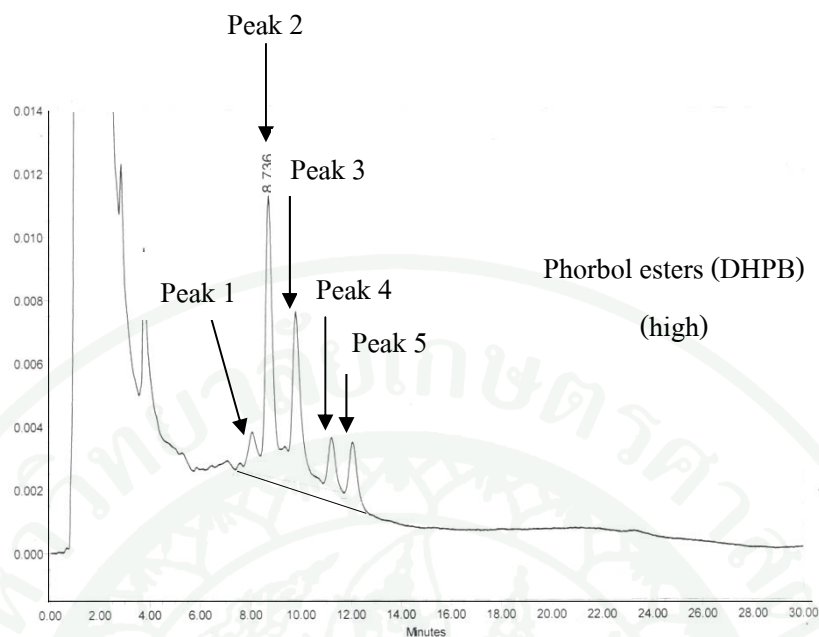
แม้ว่า PEs ที่พบในเมล็ดสบู่ดำจะเป็นแบบ DHPB (Haas and Mittelbach, 2000) แต่การคำนวณปริมาณสาร PEs ในน้ำมัน จะเปรียบเทียบกับกับกราฟมาตรฐานที่ใช้ TPA เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งเหมือนกับการรายงานของ Hass *et al.* (2000) เนื่องจากสาร PEs แบบ TPA มีขายอยู่ในท้องตลาด แต่สาร PEs แบบ DHPB ซึ่งพบในเมล็ด และน้ำมันสบู่ดำไม่มีขายในท้องตลาด (Wink *et al.*, 1997)

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร PEs ในน้ำมันสบู่ดำ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น Nabil and Yasser (2012) ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร PEs ในน้ำมันสบู่ดำ เพื่อศึกษาผลของสาร PEs ในน้ำมันสบู่ดำต่อการกำจัดแมลง Hipal *et al.* (2009) ใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร PEs ในน้ำมันสบู่ดำ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสาร PEs ในสบู่ดำ และ Nokkaew (2008) ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร PEs ในน้ำมันสบู่ดำ เพื่อศึกษาความ

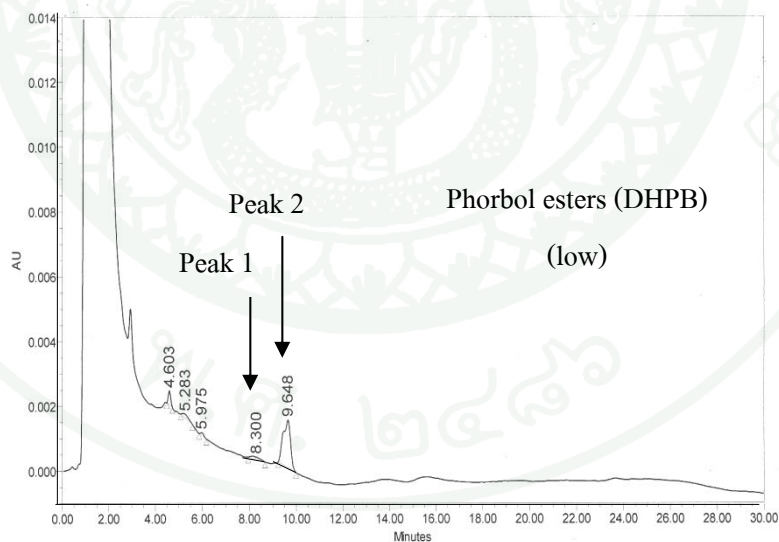
เป็นพิษและการลดพิษของน้ำมันสบูดำโดยการดูดซับ การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร PEs เนื่องจากเมทานอลเป็นสารที่กำจัดได้ง่าย ไม่ตกค้างในธรรมชาติ และมีความเป็นพิษต่ำกว่าตัวทำละลายอื่น

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณสาร PEs ในน้ำมันที่สกัดจากส่วนต่าง ๆ ของเมล็ด (P) ได้แก่ เมล็ด (whole seed) เนื้อในเมล็ด (kernel) และเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ของสบูดำ 10 สายพันธุ์ (V) โดยใช้ตัวทำละลาย (S) ที่แตกต่างกัน ได้แก่ เมทานอล HPLC grade และ เมทานอล analytical grade น้ำหนักตัวอย่าง (W) 3 ระดับ คือ 4, 5 และ 6 กรัม พบว่า ปริมาณสาร PEs ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองแบบ และน้ำหนักตัวอย่างทั้ง 3 ระดับ ให้ปริมาณสาร PEs ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้น จึงสามารถใช้ เมทานอล analytical grade แทนการใช้เมทานอล HPLC grade ซึ่งมีราคาที่สูงกว่า เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการวิเคราะห์สาร เนื่องจากมีการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในการศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ ยังสามารถใช้น้ำหนักตัวอย่าง 4 กรัม ในการสกัด ซึ่งทำให้ย่นระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างลงได้ เนื่องจากในการผสมพันธุ์สบูดำแต่ละครั้งจะต้องใช้เวลานานหลายเดือนจนกว่าจะเก็บผลผลิตได้ ถ้าใช้ตัวอย่างน้อยลงก็จะเป็นการลดเวลาในการทำงาน และยังสามารถลดปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดได้อีกด้วย เนื่องจากในการสกัดสารจำเป็นต้องเติมตัวทำละลายให้ท่วมตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างมีปริมาณมาก ปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดก็จะมาก ในทางกลับกัน ถ้าตัวอย่างมีปริมาณน้อย ปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดก็จะน้อยตามไปด้วย ในขณะที่ ส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดสบูดำทั้ง 3 ส่วน และสายพันธุ์ของสบูดำที่นำมาใช้ทั้ง 10 สายพันธุ์ ให้ปริมาณสาร PEs แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณสาร PEs ที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของสบูดำ มีปฏิสัมพันธ์กับสายพันธุ์ต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งอีกด้วย แสดงดังตารางที่ 2

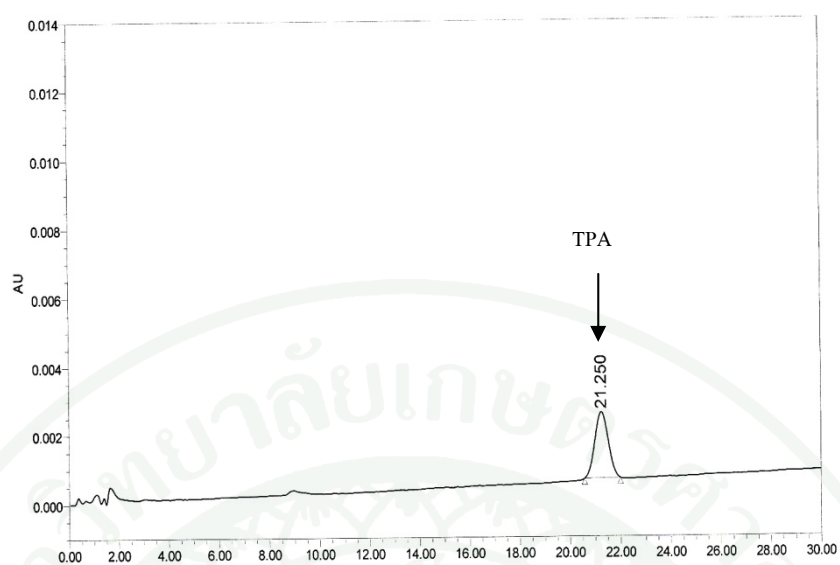
เมื่อทำการตรวจสอบค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร PEs ในน้ำมันที่สกัดจากส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดสบูดำทั้ง 10 สายพันธุ์ แบบคั่นแคน ซึ่งแสดงดังตารางที่ 3 พบว่า น้ำมันที่สกัดจากเนื้อในเมล็ดมีปริมาณสาร PEs มากที่สุด (1.297 mg/g) รองลงมา คือ น้ำมันที่สกัดจากทั้งเมล็ด (1.086 mg/g) และ น้ำมันที่สกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ด (0.593 mg/g) นอกจากนี้ยังพบว่า ทั้งเมล็ดของสายพันธุ์ KUBP (J04) มีปริมาณสาร PEs สูงที่สุด (1.783 mg/g) และส่วนของเนื้อในเมล็ด และเปลือกหุ้มเมล็ดของสายพันธุ์เวียงนาม (J07) มีปริมาณสาร PEs สูงที่สุด (2.557 mg/g และ 1.027 mg/g ตามลำดับ) ในขณะที่ ทั้งเมล็ดของสายพันธุ์เม็กชิโก 85 (J 09) มีปริมาณสาร PEs ต่ำที่สุด (0.395 mg/g) และส่วนของเนื้อในเมล็ด และเปลือกหุ้มเมล็ดของสายพันธุ์เม็กชิโก 87 (J10) มีปริมาณสาร PEs ต่ำที่สุด (0.275 mg/g และ 0.256 mg/g ตามลำดับ)



ภาพที่ 7 โครมาโตแกรมของสาร PEs ที่พบในน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดและเนื้อในเมล็ดของสบู่ดำ
สายพันธุ์ที่มีสาร PEs สูง



ภาพที่ 8 โครมาโตแกรมของสาร PEs ที่พบในน้ำมันที่สกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ด ของสบู่ดำสายพันธุ์
ที่มีสาร PEs สูง และน้ำมันที่สกัดจากเมล็ด เนื้อในเมล็ด และเปลือกหุ้มเมล็ดของสบู่ดำ
สายพันธุ์ที่มีสาร PEs ต่ำ



ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 4 β , 9 α , 12 β , 13 α , 20-pentahydroxytiglic-1, 6-dien-3-on-12 β -myristate-13 acetate (TPA)

ตารางที่ 3 การตรวจสอบค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร PEs จากส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดสนุ่นดำทั้ง 10 สายพันธุ์ แบบด้นแค่น (Duncan's Multiple Range Test; DMRT)

Treatment	PEs (mg/g)		
	Seed	Kernel	Seed coat
Varieties (V)			
J01	1.489 ab	1.766 b	0.669 ab
J02	1.497 ab	1.394 cd	0.610 ab
J03	0.947 c	1.639 bc	0.708 ab
J04	1.783 a	1.555 bcd	0.690 ab
J05	1.063 c	1.800 b	0.805 ab
J06	1.236 bc	1.318 d	0.634 ab
J07	1.615 a	2.557 a	1.027 a
J08	0.441 d	0.343 e	0.297 b
J09	0.395 d	0.325 e	0.238 b
J10	0.396 d	0.275 e	0.256 b
F-test	**	**	**
Grand Mean	1.086b	1.297a	0.593c

หมายเหตุ K = เนื้อในเมล็ด (kernel), SC = เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat), WS = เมล็ด (whole seed), J01 = สายพันธุ์ชยันต, J02 = สายพันธุ์โคราช, J03 = สายพันธุ์อินเดียน, J04 = สายพันธุ์ KUBP, J05 = สายพันธุ์พม่า 1, J06 = สายพันธุ์พม่า 2, J07 = สายพันธุ์เวียดนาม, J08 = สายพันธุ์เม็กซิโก 6, J09 = สายพันธุ์เม็กซิโก 85 และ J10 = สายพันธุ์เม็กซิโก 8

2. การศึกษา xenia effect ของลักษณะปริมาณสาร PEs

การศึกษาอิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้บนต้นแม่ (xenia effect) ของลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสบู่ดำ จากการผสมพันธุ์โดยใช้สายพันธุ์ที่มีปริมาณสาร PEs สูง (สายพันธุ์ไทย ได้แก่ สายพันธุ์ชัยนาท โคราซ และแพร์) และ สายพันธุ์ที่มีปริมาณสาร PEs ต่ำ (สายพันธุ์เม็กซิโก) จำนวน ทั้งหมด 6 คู่ผสม โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสาร PEs ที่ได้จากการทดลองที่ 1 พบว่า ปริมาณสาร PEs ที่วิเคราะห์ได้จากสบู่ดำ สายพันธุ์ชัยนาท (CN) โคราซ (K) แพร์ (P) และเม็กซิโก คือ 1.624, 2.00, 1.695 และ 0.05 mg/g ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร PEs ของลูกผสม F_1 พบว่า ลูกผสมที่มีปริมาณสาร PEs จากสูงที่สุดไปต่ำที่สุด ได้แก่ ลูกผสมคู่ที่ 3 (สายพันธุ์แพร์เป็นแม่และเม็กซิโกเป็นพ่อ) มีปริมาณสาร PEs 1.262 mg/g คู่ที่ 2 (สายพันธุ์โคราซเป็นแม่และเม็กซิโกเป็นพ่อ) มีปริมาณสาร PEs 1.160 mg/g คู่ที่ 1 (สายพันธุ์ชัยนาทเป็นแม่และเม็กซิโกเป็นพ่อ) มีปริมาณสาร PEs 0.809 mg/g คู่ที่ 4 (สายพันธุ์เม็กซิโกเป็นแม่และชัยนาทเป็นพ่อ) มีปริมาณสาร PEs 0.065 mg/g คู่ที่ 6 (สายพันธุ์เม็กซิโกเป็นแม่และแพร์เป็นพ่อ) มีปริมาณสาร PEs 0.044 mg/g และคู่ที่ 5 (สายพันธุ์เม็กซิโกเป็นแม่และโคราซเป็นพ่อ) มีปริมาณสาร PEs 0.037 mg/g ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4 จากผลการทดลอง แสดงว่า ปริมาณสาร PEs ในลูกผสม F_1 ของทุกคู่ผสมมีแนวโน้มตามสายพันธุ์แม่ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ไม่มี xenia effect ในลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสบู่ดำ เนื่องจาก xenia effect เป็นอิทธิพลของเกสรเพศผู้บนต้นแม่ ที่แสดงออกในลูกผสมรุ่น F_1 เมื่อปริมาณสาร PEs ในลูกผสมมีค่าเหมือนแม่พันธุ์จึงสามารถสรุปได้ว่า ไม่มี xenia effect

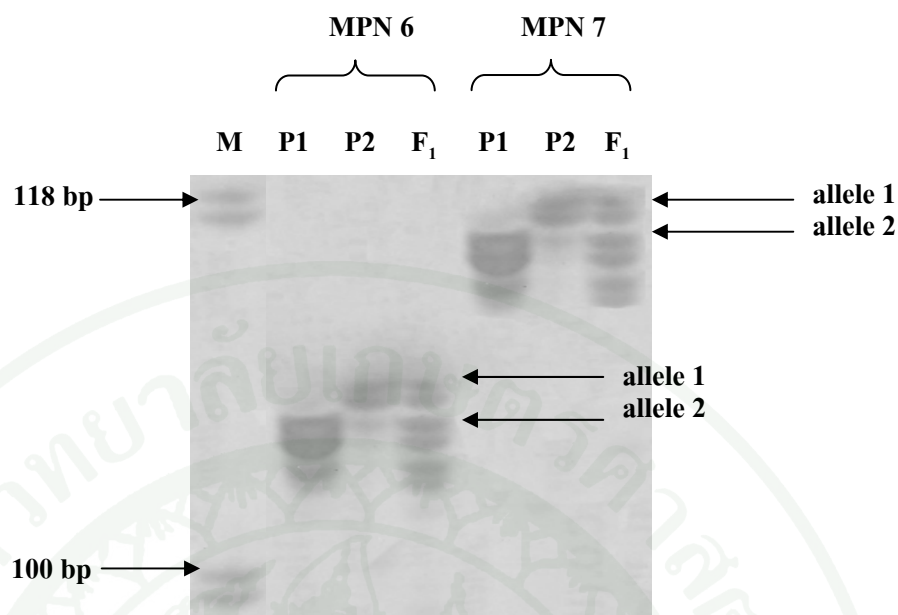
ตารางที่ 4 การแสดงอิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้บนต้นแม่ (xenia effect) ในลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสบู่ดำ

No.	Crosses	PE content (mg/g)		
		Maternal	Paternal	F ₁ seeds
1	CN × M10	1.624	0.051	0.809
2	K × M10	2.000	0.051	1.160
3	P × M10	1.695	0.051	1.262
4	M10 × CN	0.051	1.624	0.065
5	M10 × K	0.051	2.000	0.037
6	M10 × P	0.051	1.624	0.044

หมายเหตุ CN = สายพันธุ์ชยันต, K = สายพันธุ์โคราช, P = สายพันธุ์แพร่ และ M10 = สายพันธุ์เม็กซีโก

2.1 การตรวจสอบความเป็นลูกผสม

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของสบู่ดำทั้ง 78 ต้น โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR (MPN 6 และ 7) จากรายงานของ (Tanya *et al.*, 2011a) พบว่า แอลลีลเอ็นเอที่ได้จากลูกผสมทุกต้นมีรูปแบบที่เหมือนกันดังภาพที่ 10 โดยอัลลีลที่พบในลูกผสมมีจำนวน 2 อัลลีล โดยอัลลีลที่หนึ่ง ได้จากสายพันธุ์เม็กซีโก ส่วนอัลลีลที่สอง ได้จากสายพันธุ์ชยันต โดยพบว่าเมื่อใช้เครื่องหมาย MPN 6 ได้ แอลลีลเอ็นเอขนาด 109-111 bp ในขณะที่เมื่อใช้เครื่องหมาย MPN 7 ได้แอลลีลเอ็นเอขนาด 115-118 bp แสดงว่า ลูกผสมที่ได้เป็นลูกผสมที่เกิดจากสายพันธุ์พ่อและแม่ที่ทำการตรวจสอบอย่างแท้จริง เนื่องจากมีแอลลีลเอ็นเอที่ตรงกับทั้งสายพันธุ์พ่อและแม่



หมายเหตุ M = ϕ X174, P1 = สายพันธุ์ชัยนาท, P2 = สายพันธุ์เม็กซีโก และ F₁ = ลูกผสมรุ่น F₁

ภาพที่ 10 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วย SSR marker MPN 6 และ 7 ใน 4.5% polyacrylamide gel

3. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสับดูดำ

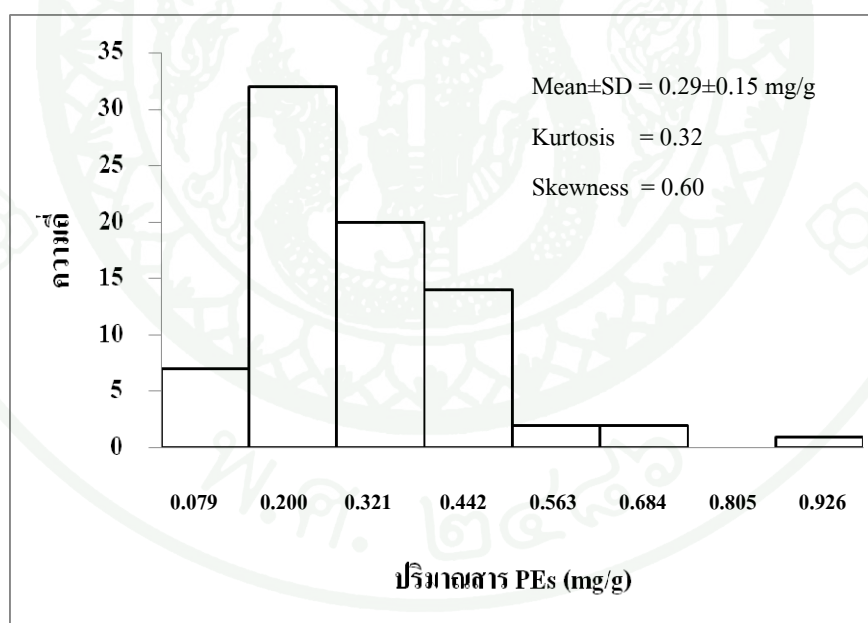
จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของความแปรปรวนของปริมาณสาร PEs ในลูกผสมตรงและลูกผสมกลับโดยการใช้โปรแกรม Microsoft excel ร่วมกับ R program พบว่า ค่าความแปรปรวนเท่ากับ 0.370 ซึ่งน้อยกว่าค่า F จากตารางมาตรฐาน ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ (2.128) ดังนั้นจึงยอมรับสมมติฐานหลัก จึงสรุปได้ว่า ความแปรปรวนของลูกผสมทั้งสองแบบเท่ากัน การวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ t-test จึงทดสอบแบบที่มีความแปรปรวนเท่ากัน พบว่าค่า t ที่คำนวณได้ เท่ากับ $|1.466|$ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่า t จากตารางมาตรฐานที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01 $|2.376|$ ดังนั้นจึงยอมรับสมมติฐานหลัก สรุปได้ว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร PEs ในลูกผสมทั้งสองแบบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01 ดังนั้น การวิเคราะห์ข้อมูลต่อไปนี้จึงนำข้อมูลที่ได้จากทั้งลูกผสมตรงและลูกผสมกลับมารวมกันเป็นประชากรเดียวเพื่อวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์หาปริมาณสาร PEs ในลูกผสมทั้งหมด 78 ต้น สามารถแจกแจงความถี่ได้เป็น 8 อันตรภาคชั้น ดังตารางที่ 5 โดยพบว่า ปริมาณสาร PEs อยู่ในช่วง 0.019 ถึง 0.986 mg/g โดยปริมาณสาร PEs ในช่วง 0.140-0.260 mg/g มีความถี่มากที่สุด สามารถเขียนกราฟการกระจายตัวของปริมาณดังกล่าวได้ดังภาพที่ 11 ซึ่งพบว่า ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการกระจายตัวของปริมาณสาร PEs ในลูกผสมสบู่ดำ มีค่าเท่ากับ 0.29 ± 0.15 mg/g มีค่าสัมประสิทธิ์ความโค้งเท่ากับ 0.32 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า โค้งความถี่มีการแจกแจงที่โค้งมาก เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ความโค้งที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 0.263 นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเบ้ที่คำนวณได้ เท่ากับ 0.60 ซึ่งมีค่ามากกว่าศูนย์ จึงสรุปได้ว่า กราฟมีการกระจายตัวแบบเบ้ขวา เมื่อพิจารณาข้อมูลปริมาณสาร PEs ที่ได้ พบว่า มีการกระจายตัวแบบต่อเนื่อง จึงคาดว่าลักษณะปริมาณสาร ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะสูง

การกระจายตัวของข้อมูลส่วนใหญ่เป็นแบบปกติ (normal distribution) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การกระจายตัวของข้อมูลมีลักษณะเบ้ขวา อาจเนื่องมาจาก จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์น้อยเกินไป ระยะการสุกแก่ของเมล็ดสบู่ดำและความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ อาจมีผลต่อปริมาณสาร PEs ที่สกัดได้ เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความไวต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงสูง และการวิเคราะห์ใช้ปริมาณสารน้อย จึงต้องใช้ความละเอียดในการทดลองเป็นอย่างมาก และผู้ทำการทดลองอาจไม่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือเท่าที่ควร จึงทำให้ผลการทดลองอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้

ตารางที่ 5 การจัดอันดับค่าของปริมาณสาร PEs ในสับดำลูกผสม 78 ต้น

Class no.	Class range (mg/g)	Class mean (mg/g)	Frequency
1	0.019-0.139	0.079	7
2	0.140-0.260	0.200	32
3	0.261-0.381	0.321	20
4	0.382-0.502	0.442	14
5	0.503-0.623	0.563	2
6	0.624-0.744	0.684	2
7	0.745-0.865	0.805	0
8	0.866-0.986	0.926	1
Total			78



ภาพที่ 11 การกระจายตัวของปริมาณสาร PEs ในลูกผสมสับดำ 78 ต้น

สรุป

1. การศึกษาหาวิธีการสกัดสาร PEs ในน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการงานปรับปรุงพันธุ์ สามารถสรุปได้ว่า การใช้เมทานอล analytical grade เป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร PEs แทนการใช้ เมทานอล HPLC grade ซึ่งมีราคาสูงกว่า ทำให้สามารถลดต้นทุนในการวิเคราะห์สารได้ เนื่องจากมีตัวอย่างที่ต้องทำการวิเคราะห์เป็นจำนวนมากในงานปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้สามารถลดจาก 6 กรัม เป็น 4 กรัม จะสามารถย่นระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง และลดการใช้สารเคมีในการวิเคราะห์ได้

2. การศึกษา xenia effect ของลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสบู่ดำ สามารถสรุปได้ว่า ไม่มี xenia effect ในลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสบู่ดำ เนื่องจากปริมาณสาร PEs ในลูกผสม F_1 มีแนวโน้มไปทางแม่พันธุ์ แสดงว่า ถ้าพันธุ์สบู่ดำที่ปรับปรุงใหม่มีปริมาณสาร PEs ต่ำ จะสามารถผลิตเมล็ดเป็นการค้าร่วมกับพันธุ์ที่มีสาร PEs สูงได้ โดยไม่ต้องกังวลว่าสาร PEs ในผลผลิตจะสูงขึ้นไม่ว่าจะได้รับการผสมจากสายพันธุ์พ่อต้นใดก็ตาม

3. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณสาร PEs ในเมล็ดสบู่ดำ สามารถสรุปได้ว่า การกระจายตัวของข้อมูลมีลักษณะเบ้ขวา เนื่องจาก ข้อมูลปริมาณสาร PEs ที่ได้มีการกระจายตัวแบบต่อเนื่อง จึงคาดว่า ลักษณะปริมาณสาร PEs เป็นลักษณะเชิงปริมาณ ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลสูงต่อการแสดงออกของลักษณะ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2552. **พื้นฐานการปรับปรุงพันธุ์พืช**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- กัลยา วานิชย์บัญชา. 2550. **การใช้ SPSS for Windows ในการวิเคราะห์ข้อมูล**. ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ชูศักดิ์ จอมพุท. 2551. **สถิติ: การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยด้านพืชไร่ด้วย R**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ชำนาญ นัตรแก้ว กรีก นฤทุม และ ชาญวิทย์ ม่วงมิตร. 2549. **สมุดคำพืชพลังงาน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. พิมพ์ที่ พับบลิชซิ่ง, กรุงเทพฯ.
- รยากร นกแก้ว วิทยา ปั่นสุวรรณ พิลาณี ไฉนอมสัจย์ และ นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์. 2550. การกำจัดฟอร์บอเลเอสเทอร์ในน้ำมันสบู่ดำโดยการดูดซับ, น. 245-251. ใน **โครงการสัมมนาวิชาการ เรื่องการประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1**. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อรรถนันท์ มงคลพร. 2548. **เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

- Aderibigbe, A.O., C.O.L.E. Johnson, H.P.S. Makkar, K. Becker and N. Foidl. 1997. Chemical composition and effect of heat on organic matter and nitrogen degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. **Anim. Feed Sci. Technol.** 64: 223-243.
- Adolf, W., J. Opferkuch and E. Hecker. 1984. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry** 23: 129-132.
- Ahmed, O.M.M. and S.E.I. Adam. 1979a. Effects of *Jatropha curcas* on calves. **Vet. Pathol.** 16: 476-482.
- _____ and _____. 1979b. Toxicity of *Jatropha curcas* in sheep and goats. **Res. Vet. Sci.** 27: 89-96.
- Ahmed, W.A. and J. Salimon. 2009. Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha curcas* seed oil. **European Journal of Scientific Research** 31: 429-436.
- Aker, C.L. 1997. Growth performance of *J. curcas*, pp. 2-18. In G.M. Gubitz, M. Mittelbach and M. Trabi, eds. **Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas***. Dbv, Graz.
- Aregheore, E.M., K. Becker and H.P.S. Makkar. 2003. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments and preliminary nutritional evaluation with rats. **S. Pac. J. Nat. Sci.** 21: 50-56.
- Azam, M.M., A. Waris and N.M. Nahar. 2005. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. **Biomass and Bioenergy** 29(40): 293-302.

- Basha, S.D., 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 Science** 6: 812-823.
- Chen, X., Y.G. Cho and S.R. McCouch. 2002. Microsatellite in *Oryza* and other plant species. **Mol. Gen. Genomic** 268: 331-343.
- Denny, J.O. 1992. Xenia include metaxenia. **HortScience** 27(7): 722-728.
- Evans, F.J. 1986. **Environmental hazards of diterpene esters from plants**. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- 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. **Natural Resource Forum** 29: 12-24.
- Gubitz, G.M., M. Mittelbach and M. Trabi. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology** 67: 73-82.
- Haas, W. and M. Mittelbach. 2000. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products** 12: 111-118.
- _____, H. Sterk and M. Mittelbach. 2002. Novel 12-deoxy-16-hydroxyl phorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas* L. **Nat. Prod.** 65: 1434-1440.
- Heller, J. 1996. **Physic nut (*Jatropha curcas* L.) - Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

- Hipal, G., G. Mayank, G. Nikhil, T. Soham, P. Prasad, G. Girish, K.K. Vamsi, M.P. Reddy, B.D. Sethiya and M.R. Rathod. 2009. Isolation and characterization of phorbol esters (toxin) from the *Jatropha curcas* L. **Microbiology Research** 1: 1-7.
- Husgen, A.G. and R. Schuster. 2001. **HPLC for food analysis**. Agilent Technologies, Hewlett Packard, United States.
- Li, C.Y., R.K. Devappa, J.X. Liu, J.M. Lv, H.P.S. Makkar and K. Becker. 2010. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. **Food Chem. Toxicol.** 48: 620-625.
- Liberalino, A.A., E.A. Bambirra, T. Moraes-Santos and E.C. Viera. 1988. *Jatropha curcas* L. seed: chemical analysis and toxicity. **Arq. Biol. Technol.** 31: 539-550.
- Makkar, H.P.S., A.O. Aderibigbe and K. Becker. 1998a. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chem.** 62(2): 207-215.
- _____ and K. Becker. 1997. Potential of *J. curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed; constraints to its utilisation and possible strategies to overcome constraints, pp.190–205. In: G.M. Gubitz, M. Mittelbach and M. Trabi, eds. **Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas***. Dbv, Graz.
- _____, _____ and B. Schmook. 1998b. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roostate of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. **Plant Foods Human Nutr.** 52: 31-36.
- _____, _____, F. Sporer and M. Wink. 1997. Studies on Nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Agriculture Food Chemistry** 45: 3152-3157.

- Mampane, K.J., P.H. Joubert and L.T. Hay. 1987. *Jatropha curcas*: use as a traditional Tswana medicine and its role as a cause of acute poisoning. **Phytotherapy Res.** 1: 50-51.
- Nabil, A.E.A. and A.M.K. Yasser. 2012. *Jatropha curcas* oil as insecticide and germination promoter. **J. Appl. Sci. Res.** 8: 668-675.
- Nokkaew, R. 2008. **Elimination of Phorbol Esters in Seed Oil and Press Cake of *Jatropha Curcas* L.** M.Sc. Thesis, Kasetsart University.
- Pamidiamarri, S.D.V., S. Singh, S.G. Mastan, J. Patel and M.P. Reddy. 2008. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Mol. Biol. Rep.** 36: 1357-1364.
- Phumichai, C., T. Phumichai, N. Kongsiri, A. Wongkaew, P. Sripichit and R. Kaveeta. 2011. Isolation of 55 microsatellite markers for *Jatropha curcas* and its closely related species. **Biologia Plantarum** 55: 387-390.
- Putten, E.V.D., Y.J. Franken and J.D. Jongh. 2010. General data on jatropha, pp. 1-7. In J.D. Jongh, ed. **The jatropha handbook from cultivation to application**. Netherlands.
- R Development Core Team. 2010. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0. Available source: [http:// R-project.org](http://R-project.org), March 1, 2010.
- Schmook, B. and L.S. Perez. 1997. *J. curcas*: distribution and uses in the Yucatan Peninsula of Mexico, pp. 53-57. In G.M. Gubitz, M. Mittelbach and M. Trabi, eds. **Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas***. Dbv, Graz.
- Schlötterer, C. 2001. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma** 109: 365–371.

Sujatha, M. 2006. Genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: possibilities and prospects.

Indian J. of Agroforestry 8: 58–65.

_____, T.P. Reddy and M.J. Mahasi. 2008. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnological Advances** 26: 424-435.

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.

Tanya, P., S. Dachapak, M.M. Tar and P. Srinives. 2011a. New microsatellite markers classifying nontoxic and toxic *Jatropha curcas*. **J. Genet.** 90: 76-78.

_____, P. Taeprayoon, Y. Hadkam. and P. Srinives. 2011b. Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers. **Plant Mol. Biol. Rep.** 29: 252–264.

Wen, M., H. Wang, Z. Xia, M. Zou, C. Lu and W. Wang. 2010. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. **Bio. Med. Central.** 3: 42-49.

Wink, M., C. Koschmieder, M. Sauerwein and F. Sporer. 1997. Phorbol Esters of *Jatropha curcas*-biological activities and potential applications, pp. 160-166. In G.M. Gubitz, M. Mittelbach and M. Trabi, eds. **Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas***. Dbv, Graz.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณสาร PEs ในเนื้อในเมล็ด (kernel) ที่สกัดด้วยเมทานอล HPLC grade

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
1	J01	4	1.2668	1.8933	2.0342
2	J01	5	1.3313	1.9104	1.8815
3	J01	6	1.4844	1.9040	1.8247
4	J02	4	1.1036	1.5944	1.3620
5	J02	5	1.1492	1.8225	1.3173
6	J02	6	1.1162	1.6159	1.4164
7	J03	4	1.2519	1.8447	2.1009
8	J03	5	1.2776	1.9556	1.9788
9	J03	6	1.2008	1.8873	1.7572
10	J04	4	0.8232	1.7366	1.4422
11	J04	5	1.7673	1.7791	1.6174
12	J04	6	1.4373	2.0279	1.6558
13	J05	4	1.4591	1.9172	1.5383
14	J05	5	1.3202	2.4783	1.7638
15	J05	6	1.4890	2.1641	1.8676
16	J06	4	0.7807	1.5880	1.5132
17	J06	5	0.7833	1.3525	1.6561
18	J06	6	1.0405	1.2350	1.2418
19	J07	4	2.1548	2.8756	2.3135
20	J07	5	3.0203	2.9144	2.1863
21	J07	6	2.6895	3.0504	2.2332

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
22	J08	4	0.1560	0.1909	0.1976
23	J08	5	0.1929	0.4832	0.2912
24	J08	6	0.1851	0.6068	0.3041
25	J09	4	0.1124	0.1600	0.1283
26	J09	5	0.1830	0.4035	0.1414
27	J09	6	0.1395	0.3412	0.1294
28	J10	4	0.2425	0.2981	0.1494
29	J10	5	0.2918	0.2458	0.1217
30	J10	6	0.1119	0.4629	0.1128

หมายเหตุ J01 = สายพันธุ์ชัยนาท, J02 = สายพันธุ์โคราช, J03 = สายพันธุ์อินเดีย, J04 = สายพันธุ์ KUBP, J05 = สายพันธุ์พม่า 1, J06 = สายพันธุ์พม่า 2, J07 = สายพันธุ์เวียตนาม, J08 = สายพันธุ์เม็กซิโก 6, J09 = สายพันธุ์เม็กซิโก 85 และ J10 = สายพันธุ์เม็กซิโก 87

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณสาร PEs ในเนื้อในเมล็ด (kernel) ที่สกัดด้วยเมทานอล analytical grade

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
1	J01	4	1.5604	1.8442	1.9831
2	J01	5	1.5580	1.9357	1.6785
3	J01	6	1.5416	1.8583	2.2904
4	J02	4	1.1214	2.1347	1.2960
5	J02	5	1.1536	1.7457	1.4067
6	J02	6	1.1201	1.3596	1.2510
7	J03	4	1.2383	1.7793	1.2943
8	J03	5	1.0348	1.9786	1.7289
9	J03	6	1.0959	2.4253	1.6757
10	J04	4	1.4617	2.1092	1.3207
11	J04	5	1.1129	1.4816	1.2956
12	J04	6	1.2923	2.0546	1.5649
13	J05	4	1.4647	1.9578	1.7164
14	J05	5	1.3697	2.1650	1.8492
15	J05	6	1.9180	2.1179	1.8346
16	J06	4	1.2659	2.0077	1.2881
17	J06	5	0.9975	1.7919	1.2959
18	J06	6	0.9958	1.5223	1.3730
19	J07	4	2.6188	2.6171	2.3750
20	J07	5	2.5400	2.9407	1.9835
21	J07	6	2.7204	2.6733	2.1185

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
22	J08	4	0.0975	0.5089	0.1736
23	J08	5	0.3684	0.6119	0.3623
24	J08	6	0.4565	0.6216	0.3580
25	J09	4	0.4249	0.5102	0.4391
26	J09	5	0.3751	0.6149	0.2850
27	J09	6	0.4740	0.5618	0.4319
28	J10	4	0.1160	0.2792	0.1037
29	J10	5	0.4698	0.6813	0.1405
30	J10	6	0.4238	0.6031	0.0985

หมายเหตุ J01 = สายพันธุ์ชัยนาท, J02 = สายพันธุ์โคราซ, J03 = สายพันธุ์อินเดีย, J04 = สายพันธุ์ KUBP, J05 = สายพันธุ์พม่า 1, J06 = สายพันธุ์พม่า 2, J07 = สายพันธุ์เวียตนาม, J08 = สายพันธุ์เม็กซิโก 6, J09 = สายพันธุ์เม็กซิโก 85 และ J10 = สายพันธุ์เม็กซิโก 87

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณสาร PEs ในเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ที่สกัดด้วยเมทานอล HPLC grade

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
1	J01	4	1.8933	0.0718	0.0456
2	J01	5	1.9104	0.0595	0.0446
3	J01	6	1.9040	0.0811	0.0708
4	J02	4	1.5944	0.0660	0.0390
5	J02	5	1.8225	0.0634	0.0370
6	J02	6	1.6159	0.0811	0.0657
7	J03	4	1.8447	0.1047	0.0457
8	J03	5	1.9556	0.0717	0.1442
9	J03	6	1.8873	0.0921	0.0729
10	J04	4	1.7366	0.1384	0.0967
11	J04	5	1.7791	0.1125	0.2094
12	J04	6	2.0279	0.1428	0.1401
13	J05	4	1.9172	0.1403	0.1276
14	J05	5	2.4783	0.1644	0.1490
15	J05	6	2.1641	0.2379	0.2524
16	J06	4	1.5880	0.2389	0.2250
17	J06	5	1.3525	0.1612	0.1509
18	J06	6	1.2350	0.1772	0.1496
19	J07	4	2.8756	0.1770	0.1413
20	J07	5	2.9144	0.1212	0.0966
21	J07	6	3.0504	0.1266	0.0785

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
22	J08	4	0.1909	0.2714	0.1889
23	J08	5	0.4832	0.1396	0.1105
24	J08	6	0.6068	0.2009	0.1633
25	J09	4	0.1600	0.0721	0.0783
26	J09	5	0.4035	0.0733	0.0817
27	J09	6	0.3412	0.1586	0.1603
28	J10	4	0.2981	0.1401	0.1424
29	J10	5	0.2458	0.1705	0.1213
30	J10	6	0.4629	0.2555	0.2618

หมายเหตุ J01 = สายพันธุ์ชัยนาท, J02 = สายพันธุ์โคราช, J03 = สายพันธุ์อินเดีย, J04 = สายพันธุ์ KUBP, J05 = สายพันธุ์พม่า 1, J06 = สายพันธุ์พม่า 2, J07 = สายพันธุ์เวียตนาม, J08 = สายพันธุ์เม็กซิโก 6, J09 = สายพันธุ์เม็กซิโก 85 และ J10 = สายพันธุ์เม็กซิโก 87

ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณสาร PEs ในเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ที่สกัดด้วยเมทานอล analytical grade

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
1	J01	4	1.8442	0.0667	0.0454
2	J01	5	1.9357	0.0505	0.0379
3	J01	6	1.8583	0.0663	0.0462
4	J02	4	2.1347	0.0648	0.0583
5	J02	5	1.7457	0.0820	0.0553
6	J02	6	1.3596	0.0491	0.0363
7	J03	4	1.7793	0.0892	0.0480
8	J03	5	1.9786	0.0456	0.0654
9	J03	6	2.4253	0.0497	0.0358
10	J04	4	2.1092	0.0702	0.0773
11	J04	5	1.4816	0.0502	0.0726
12	J04	6	2.0546	0.0586	0.0603
13	J05	4	1.9578	0.1591	0.1291
14	J05	5	2.1650	0.0929	0.0712
15	J05	6	2.1179	0.0907	0.0685
16	J06	4	2.0077	0.1884	0.1802
17	J06	5	1.7919	0.1172	0.1026
18	J06	6	1.5223	0.1157	0.1049
19	J07	4	2.6171	0.1615	0.1253
20	J07	5	2.9407	0.1296	0.0760
21	J07	6	2.6733	0.1081	0.0774

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
22	J08	4	0.5089	0.2649	0.2291
23	J08	5	0.6119	0.2439	0.1996
24	J08	6	0.6216	0.1586	0.1460
25	J09	4	0.5102	0.1120	0.1321
26	J09	5	0.6149	0.2830	0.3467
27	J09	6	0.5618	0.0783	0.1201
28	J10	4	0.2792	0.2315	0.2349
29	J10	5	0.6813	0.1505	0.1494
30	J10	6	0.6031	0.2007	0.2116

หมายเหตุ J01 = สายพันธุ์ชัยนาท, J02 = สายพันธุ์โคราซ, J03 = สายพันธุ์อินเดีย, J04 = สายพันธุ์ KUBP, J05 = สายพันธุ์พม่า 1, J06 = สายพันธุ์พม่า 2, J07 = สายพันธุ์เวียตนาม, J08 = สายพันธุ์เม็กซิโก 6, J09 = สายพันธุ์เม็กซิโก 85 และ J10 = สายพันธุ์เม็กซิโก 87

ตารางผนวกที่ 5 ปริมาณสาร PEs ในเมล็ด (whole seed) ที่สกัดด้วยเมทานอล HPLC grade

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
1	J01	4	1.3454	1.9839	1.4339
2	J01	5	0.9296	1.3822	1.9605
3	J01	6	1.0610	1.8159	2.0276
4	J02	4	0.8359	1.1899	1.3936
5	J02	5	0.7985	1.7383	1.4087
6	J02	6	0.7503	2.2193	1.2680
7	J03	4	1.0035	0.7154	0.6439
8	J03	5	0.7975	1.0776	0.8826
9	J03	6	0.8236	2.2551	0.9973
10	J04	4	1.7986	1.8036	1.9056
11	J04	5	2.1517	1.8458	1.3715
12	J04	6	1.8065	1.6807	1.6684
13	J05	4	0.8584	1.4781	1.6357
14	J05	5	0.8120	0.8345	0.8820
15	J05	6	0.8322	0.8892	1.1354
16	J06	4	1.1358	1.8570	1.4650
17	J06	5	1.1819	0.8452	1.2179
18	J06	6	0.7990	1.7624	1.0998
19	J07	4	1.5096	1.6979	1.4598
20	J07	5	1.2963	1.7279	1.2996
21	J07	6	1.8294	1.5736	1.2655

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
22	J08	4	0.6651	0.3958	0.2714
23	J08	5	0.6474	0.6699	0.2184
24	J08	6	0.4102	0.2305	0.2273
25	J09	4	0.5870	0.5636	0.6539
26	J09	5	0.3888	0.5831	0.4572
27	J09	6	0.3623	0.3938	0.4427
28	J10	4	0.4697	0.2952	0.2036
29	J10	5	0.4461	0.4898	0.1851
30	J10	6	0.4667	0.5720	0.2780

หมายเหตุ J01 = สายพันธุ์ชัยนาท, J02 = สายพันธุ์โคราซ, J03 = สายพันธุ์อินเดีย, J04 = สายพันธุ์ KUBP, J05 = สายพันธุ์พม่า 1, J06 = สายพันธุ์พม่า 2, J07 = สายพันธุ์เวียตนาม, J08 = สายพันธุ์เม็กซิโก 6, J09 = สายพันธุ์เม็กซิโก 85 และ J10 = สายพันธุ์เม็กซิโก 87

ตารางผนวกที่ 6 ปริมาณสาร PEs ในเมล็ด (whole seed) ที่สกัดด้วยเมทานอล analytical grade

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
1	J01	4	2.4569	1.5133	1.2694
2	J01	5	0.8698	1.4024	1.1923
3	J01	6	1.0041	1.7887	1.3676
4	J02	4	3.3915	2.5607	0.7790
5	J02	5	0.7534	2.5523	1.1174
6	J02	6	0.8181	2.0686	1.3101
7	J03	4	0.4654	0.5816	0.5046
8	J03	5	0.7173	1.7525	0.9885
9	J03	6	0.7943	1.1290	0.9105
10	J04	4	1.9031	1.8232	1.8828
11	J04	5	1.5899	1.8301	1.7369
12	J04	6	1.7453	1.8972	1.6537
13	J05	4	0.9312	0.9854	0.7595
14	J05	5	0.8547	1.7650	1.1476
15	J05	6	1.1231	1.1270	1.0908
16	J06	4	1.1883	1.6516	1.2854
17	J06	5	0.8216	1.1557	0.9818
18	J06	6	0.7734	2.0670	0.9602
19	J07	4	1.7345	1.6150	1.6911
20	J07	5	2.5330	1.5643	1.3827
21	J07	6	1.8094	1.6773	1.4011

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

No.	Varieties	Weight (g)	PEs (mg/g)		
			determination 1	determination 2	determination 3
22	J08	4	0.5481	0.7017	0.2811
23	J08	5	0.5037	0.6133	0.2294
24	J08	6	0.4879	0.5876	0.2515
25	J09	4	0.3452	0.3036	0.2838
26	J09	5	0.2051	0.2170	0.1864
27	J09	6	0.3891	0.4837	0.2724
28	J10	4	0.8409	0.2083	0.3454
29	J10	5	0.5442	0.2864	0.4046
30	J10	6	0.3572	0.2178	0.5172

หมายเหตุ J01 = สายพันธุ์ชัยนาท, J02 = สายพันธุ์โคราซ, J03 = สายพันธุ์อินเดีย, J04 = สายพันธุ์ KUBP, J05 = สายพันธุ์พม่า 1, J06 = สายพันธุ์พม่า 2, J07 = สายพันธุ์เวียตนาม, J08 = สายพันธุ์เม็กซิโก 6, J09 = สายพันธุ์เม็กซิโก 85 และ J10 = สายพันธุ์เม็กซิโก 87

ตารางผนวกที่ 7 ปริมาณสาร PEs ในเมล็ดลูกผสมรุ่น F₂ จำนวน 27 ต้น จากการใช้สายพันธุ์ชันนาท เป็นแม่และเม็กชิโกเป็นพ่อ (direct cross)

No.	PEs (mg/g)
1	0.121
2	0.383
3	0.373
4	0.404
5	0.405
6	0.231
7	0.212
8	0.125
9	0.192
10	0.342
11	0.490
12	0.258
13	0.149
14	0.372
15	0.263
16	0.330
17	0.273
18	0.247
19	0.268
20	0.272
21	0.168
22	0.201
23	0.120
24	0.155
25	0.211
26	0.230
27	0.129

ตารางผนวกที่ 8 ปริมาณสาร PEs ในเมล็ดลูกผสมรุ่น F_2 จำนวน 51 ต้น จากการใช้สายพันธุ์
เม็กซีโกเป็นแม่และชันนาทเป็นพ่อ (reciprocal cross)

No.	PEs (mg/g)
1	0.272
2	0.220
3	0.259
4	0.215
5	0.200
6	0.201
7	0.108
8	0.651
9	0.386
10	0.319
11	0.154
12	0.305
13	0.204
14	0.213
15	0.252
16	0.147
17	0.020
18	0.247
19	0.203
20	0.230
21	0.148
22	0.143
23	0.315
24	0.390
25	0.246
26	0.236

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

No.	PEs (mg/g)
27	0.387
28	0.265
29	0.895
30	0.558
31	0.268
32	0.387
33	0.212
34	0.477
35	0.362
36	0.458
37	0.420
38	0.262
39	0.198
40	0.303
41	0.581
42	0.720
43	0.143
44	0.019
45	0.287
46	0.461
47	0.266
48	0.243
49	0.457
50	0.424
51	0.369

การวิเคราะห์การแจกแจงความถี่

$$\begin{aligned}
 1. \text{ จำนวนชั้น (k)} &= 1 + 3.322 \log N \\
 &\text{เมื่อ } N \text{ คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด} \\
 &= 1 + 3.322 \log (78) \\
 &= 1 + 3.322 (1.89) \\
 &= 7.279 \sim 8
 \end{aligned}$$

∴ จำนวนชั้นที่เหมาะสม คือ 8 ชั้น

$$\begin{aligned}
 2. \text{ ค่าพิสัย} &= \text{ค่าสูงสุด} - \text{ค่าต่ำสุด} \\
 &= 0.895 - 0.019 \\
 &= 0.877 \sim 0.88
 \end{aligned}$$

∴ ค่าพิสัย คือ 0.88

$$\begin{aligned}
 3. \text{ จำนวนข้อมูลที่จะจัดเข้าสู่ชั้น} &= \text{ค่าพิสัย} + 1 \\
 &= 0.88 + 1 \\
 &= 1.88
 \end{aligned}$$

∴ จำนวนข้อมูลที่จะจัดเข้าสู่ชั้น 1.88

$$\begin{aligned}
 4. \text{ จำนวนชั้น} &= \frac{\text{ค่าพิสัย}}{\text{จำนวนชั้น}} \\
 &= \frac{0.88}{8} \\
 &= 0.11
 \end{aligned}$$

∴ ความกว้างชั้นที่เหมาะสม คือ 0.11

$$\begin{aligned}
 5. \text{ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน} &= \sqrt{\frac{\sum f(X_i - \bar{X})^2}{n}} \\
 &= \sqrt{\frac{(7)(0.019 - 0.290)^2 + \dots + (1)(0.895 - 0.290)^2}{78}} \\
 &= 0.15
 \end{aligned}$$

∴ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน คือ 0.15

$$\begin{aligned} 6. \text{ ค่าเฉลี่ย} &= \frac{(0.019 + 0.020 + \dots + 0.720 + 0.895)}{78} \\ &= 0.29 \end{aligned}$$

∴ ค่าเฉลี่ย คือ 0.29

$$\begin{aligned} 7. \text{ ความโค้ง (kurtosis)} &= \frac{(Q_3 - Q_2) - (Q_2 - Q_1)}{Q_3 - Q_1} \\ &= \frac{(0.3755 - 0.2605) - (0.2605 - 0.201)}{0.3755 - 0.201} \\ &= 0.32 \end{aligned}$$

∴ ความโค้ง คือ 0.32

$$\begin{aligned} 8. \text{ ความเบ้ (skewness)} &= \frac{3(\text{mean} - \text{median})}{\text{SD}} \\ &= \frac{3(0.290 - 0.261)}{0.149} \\ &= 0.60 \end{aligned}$$

∴ ความเบ้ คือ 0.60

หมายเหตุ ใช้ข้อมูลจากตารางผนวกที่ 7 และ 8 ในการวิเคราะห์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอังคณา จงเชิดชูตระกูล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	29 กรกฎาคม พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37 (วทท 37)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนโครงการสร้างขีดความสามารถด้านการวิจัยและพัฒนาและการแข่งขันของภาคอุตสาหกรรมโดยกลไกความร่วมมือระหว่างภาครัฐ เอกชน และมหาวิทยาลัย (University Industry Research Collaboration Program: U-IRC) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)