



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสนับดำ

Development of Microsatellite Markers for *Jatropha curcas* L.

นามผู้วิจัย นางสาวณัฐวี รัตนมณี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, Dr.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสับงูดำ

Development of Microsatellite Markers for *Jatropha curcas* L.

โดย

นางสาวญาดวี รัตนมณี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ญาทวี รัตนมณี 2553: การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับสับดูดา
ปริญญาวิตายาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภา หงษ์ตระกูล, Ph.D. 120 หน้า

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อการจัดจำแนกพันธุ์ และระบุพันธุ์จำเพาะในสับดูดา (*Jatropha curcas* L.) โดยวิธี enrichment โดยใช้ไบโอดีโนลิโกนิวคลีโอไทด์ โพรบชนิด B-(GA)₁₅, B-(CA)₁₅, B-(ACC)₁₀ และ B-(CCT)₁₀ และคัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค dot blot hybridization จากการตรวจสอบพบโคลนที่เป็นบวก 108 โคลน เมื่อนำโคลนจำนวน 97 โคลน ไปหาลำดับเบสพบว่า มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์รวม 58 โคลน คิดเป็น 59.79 เปอร์เซ็นต์ ของโคลนที่ส่งหาลำดับเบส โดยส่วนใหญ่เป็นลำดับไมโครแซทเทลไลต์แบบ dinucleotide repeat ชนิด (GA)_n คิดเป็น 32.76 เปอร์เซ็นต์ และ trinucleotide repeat (GGA)_n คิดเป็น 20.70 เปอร์เซ็นต์ สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 38 คู่ และนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับดูดา 125 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากประเทศไทย และต่างประเทศ พบ 5 คู่ไพรเมอร์ ให้ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ศึกษา โดยมีจำนวน 2 แอลลีลต่อตำแหน่ง มีค่า PICs (Polymorphic Information Contents) อยู่ในช่วง 0.15-0.22 และค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.21 เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc-2.20k พบว่า สามารถแบ่งสับดูดาทั้ง 125 ตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มสับดูดาพันธุ์ที่มีพืชในประเทศ และจากต่างประเทศ และกลุ่มที่ 2 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยเป็นสับดูดาพันธุ์ไม่มีพืชจากประเทศเม็กซิโก ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.72-1.00 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสับดูดา 67 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ด้วยไพรเมอร์ 8 ชนิด พบว่าให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 96 แถบ โดยเป็น polymorphic bands 16 แถบ มีค่า PICs อยู่ในช่วง 0.00-0.36 และค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.06 เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สับดูดาพันธุ์มีพืช และสับดูดาพันธุ์ไม่มีพืช โดยมีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.91-1.00 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล AS-PCR (Allele Specific-PCR) จำเพาะกับยีนในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันจำนวน 6 ยีน ได้แก่ *KASIII* (beta-ketoacyl-ACP synthase III), *KASII* (beta-ketoacyl-ACP synthase II), *SAD* (stearoyl-ACP desaturase), *FatA* (acyl-ACP thioesterase), *FAD3* (ω -3 fatty acid desaturase) และ *FAD6* (ω -6 fatty acid desaturase) โดยใช้ลำดับเบสของยีนพืชจากฐานข้อมูล GenBank และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค DFLP (DNA Fragment Length Polymorphism) และเทคนิค SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) กับสับดูดา 125 ตัวอย่าง พบว่าให้แถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียว แสดงให้เห็นว่าสับดูดามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก อย่างไรก็ตามเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีนทั้ง 6 ยีน ให้แถบดีเอ็นเอต่างรูปแบบในพืชสกุล *Jatropha* ชนิดอื่น ได้แก่ สับดูแดง (*Jatropha gossypifolia*) เข็มปัตตาเวีย (*Jatropha integerrima*) ฝิ่นต้น (*Jatropha multifida*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับสับดูดา เครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีนนี้ สามารถใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในการผสมข้ามชนิด และข้ามสกุล และเพื่อโครงการปรับปรุงพันธุ์สับดูดาต่อไปในอนาคต

Yatavee Rattanamanee 2010: Development of Microsatellite Markers for *Jatropha curcas* L..
Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor:
Assistant Professor Vipa Hongtrakul, Ph.D. 120 pages.

This research is to develop microsatellite DNA markers for classification and varietal specific identification in physic nut (*Jatropha curcas* L.) from the enrich library using biotin-oligonucleotide probes of B-(GA)₁₅, B-(CA)₁₅, B-(ACC)₁₀ and B-(CCT)₁₀. One hundred and eight positive clones were selected by dot blot hybridization and 97 clones were sent for sequencing. A total of 58 clones (59.79 %) were found to contain microsatellite sequences. Most abundant iterated sequences were dinucleotide repeat of (GA)_n (32.76 %) and trinucleotide repeat of (GGA)_n (20.70 %). Thirty eight primer pairs were designed and were used to evaluate genetic diversity among 125 physic nut samples collected from Thailand and foreign countries. Only five polymorphic markers were obtained and only two alleles per marker were observed. Polymorphic Information Contents (PICs) ranged from 0.15-0.22 with an average PIC score of 0.21. Cluster analysis using computer program NTSYSpc-2.20k was performed and could classify all 125 samples into 2 groups, group I consisted of toxic samples from Thailand and foreign countries and group II was composed of 2 subgroups containing non toxic samples from Mexico. Genetic similarity ranged from 0.72-1.00. Genetic relationship among 67 samples was also estimated using 8 ISSR primers. A total of 96 bands or markers were generated with 16 polymorphic markers observed. PICs ranged from 0.00-0.36 with an average PIC score of 0.06. Cluster analysis could separate all 67 physic nut samples into 2 groups of toxic and non toxic samples. Genetic similarity ranged from 0.91-1.00. AS-PCR (Allele Specific PCR) markers were developed specific for 6 genes in fatty acid synthesis pathway, i.e. *KASIII* (*beta-ketoacyl-ACP synthase III*), *KASII* (*beta-ketoacyl-ACP synthase II*), *SAD* (*stearoyl-ACP desaturase*), *FatA* (*acyl-ACP thioesterase*), *FAD3* (*ω-3 fatty acid desaturase*) and *FAD6* (*ω-6 fatty acid desaturase*) based on plant gene sequences available in GenBank. All gene specific markers were used to produce DNA fingerprints of 125 physic nut samples using DFLP (DNA Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) techniques. The results showed no polymorphism among 125 physic nut samples, suggesting very low genetic variation in this plant. However, the specific markers developed were found to be polymorphic among plants in the genus *Jatropha* (*Jatropha gossypifolia*, *Jatropha integerrima* and *Jatropha multifida*) and *Ricinus communis* which was also in the family Euphorbiaceae. These gene specific markers could be used for hybridity test from both interspecific and intergeneric hybridizations and for the improvement project of physic nut in the future.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล ประธานกรรมการ ที่ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำตลอดช่วงเวลาที่ทำงานวิจัย รวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในงานวิจัย รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นิติศรียุทธ แสงเดือน ประธานการสอบ และ ดร. อนวัช สุวรรณกุล ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณะอาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอน ถ่ายทอดวิชาความรู้ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา

ขอบขอบคุณ นายศิริศักดิ์ สุนทรยาตร, นางปิยมาศ ผ่องแก้ว, นางเมธานี หอมทอง, นายฐิติ กาญจนเกตุ, นางสาวปรารถนา เพือกวิไล, นางสาวกนกวรรณ แดงสวัสดิ์, นางสาวธนาวดี คำชู และนางสาวเมทินี กลัดมุข รวมทั้งสมาชิกทุกคนในห้องปฏิบัติการ 4511 ภาควิชาพันธุศาสตร์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน และเป็นกำลังใจที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่คอยดูแล เป็นกำลังใจ และสนับสนุนกำลังใจทรัพย์ ตลอดจนคอยช่วยเหลือในทุกสิ่งจนสำเร็จ การศึกษา

ญาดาวิ รัตนมณี
เมษายน 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	31
อุปกรณ์	31
วิธีการ	39
ผลและวิจารณ์	49
สรุป	99
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	102
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	120

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อสปีดที่รวบรวมจากในประเทศ ต่างประเทศ และพืชชนิดอื่นในวงศ์ Euphorbiaceae	31
2	จำนวนโคลนที่ได้จากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ชั้นต่าง ๆ จากห้องสมุดจีโนม	52
3	ลำดับเบสแบบไมโครแซเทลไลต์ชนิดต่าง ๆ ที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์	54
4	ลำดับเบสของไพรเมอร์ ชนิดของลำดับเบสซ้ำที่อยู่ในระหว่างคู่ไพรเมอร์ ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ และค่า T_m ของไพรเมอร์ทั้ง 18 คู่	58
5	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในสปีดจากไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์แต่ละชนิด และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง	66
6	การตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในพืชชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษา	97

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ (A) ลำต้น (B) ใบ (C) ดอก (D) ผล และ (E) เมล็ด	9
2 แถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอสบู่ดำด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรส	49
3 จีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>MseI</i> และต่อกับ adaptor หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	50
4 ดีเอ็นเอที่ไฮบริดซ์กับไบโอดีเอ็นเอโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ (GA) ₁₅ , (CA) ₁₅ , (ACC) ₁₀ และ (CCT) ₁₀ หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	51
5 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของสบู่ดำด้วยคู่มือ (A) JC USA_12 และ (B) JC NRM_20 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)	60
6 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างของสบู่ดำ 125 ตัวอย่าง สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ โดยใช้วิธี UPGMA ในโปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k	62
7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ 16 ชนิดกับสบู่ดำ 2 ตัวอย่าง คือ สบู่ดำพันธุ์นครราชสีมา 1 (8) และ สบู่ดำพันธุ์สหรัฐอเมริกา (31)	64
8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (AC) ₈ YG กับสบู่ดำ 67 ตัวอย่าง (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)	69
9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (ATG) ₅ กับสบู่ดำ 67 ตัวอย่าง (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)	71
10 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างสบู่ดำ 67 ตัวอย่าง สร้างโดยอาศัยข้อมูลจาก (A) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (B) เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (C) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และไอเอสเอสอาร์ร่วมกัน โดยใช้วิธี UPGMA ในโปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k	73

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
11 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับ ยีน <i>KASIII</i> (Δ ตำแหน่งของ intron 1)	76
12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำเพาะสำหรับยีน <i>KASIII</i> ในสบู่ดำ (A) ด้วยเทคนิค DFLP (B) เทคนิค SSCP และ (C) เทคนิค DFLP และ SSCP ในพืชสกุล <i>Jatropha</i> และละหุ่ง	77
13 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับ ยีน <i>KASII</i> (Δ คือ ตำแหน่งของ intron 1)	80
14 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำเพาะสำหรับยีน <i>KASII</i> ในสบู่ดำ (A) ด้วยเทคนิค DFLP (B) เทคนิค SSCP และ (C) ด้วยเทคนิค DFLP และเทคนิค SSCP ในพืชสกุล <i>Jatropha</i> และละหุ่ง	81
15 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะ กับยีน <i>SAD</i> (Δ คือ ตำแหน่งของ intron 2)	84
16 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำเพาะสำหรับยีน <i>SAD</i> (A) ด้วยเทคนิค SSCP ในสบู่ดำ และ (B) ด้วยเทคนิค DFLP และเทคนิค SSCP ในพืชสกุล <i>Jatropha</i>	85
17 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับ ยีน <i>FatA</i> ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ <i>B. napus</i> (X87842) และ cDNA ของสบู่ดำ และ <i>B. napus</i> ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 1-intron 1-exon 2-intron 2-exon 3	87

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำเพาะสำหรับยีน <i>FatA</i> (A) ด้วยเทคนิค DFLP ในสบู่ดำ (B) เทคนิค SSCP ในสบู่ดำ และ (C) ด้วยเทคนิค DFLP และเทคนิค SSCP ในพืชสกุล <i>Jatropha</i>	88
19	ตำแหน่ง และลำดับเบส forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับ ยีน <i>FAD3</i> ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA และ cDNA ของ สบู่ดำ ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 1-exon 6	91
20	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำเพาะสำหรับยีน <i>FAD3</i> กับพืชในสกุล <i>Jatropha</i> และละหุ่ง (A) ด้วยเทคนิค DFLP และ (B) เทคนิค SSCP	92
21	ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับ ยีน <i>FAD6</i> ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> (Y11689) และ cDNA ของ <i>A. thaliana</i> (NM 119243), <i>Brassica napus</i> (AY642535) และ <i>Jatropha curcas</i> (EU106889) ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 4- exon 6	94
22	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำเพาะสำหรับยีน <i>FAD6</i> กับพืชในสกุล <i>Jatropha</i> และละหุ่ง (A) ด้วยเทคนิค DFLP และ (B) เทคนิค SSCP	95

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	<u>A</u> mplified <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
AS-PCR	=	<u>A</u> llele <u>S</u> pecific- <u>P</u> CR
cDNA	=	<u>C</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u>
DFLP	=	<u>D</u> N <u>A</u> <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
FatA	=	Acyl- <u>A</u> CP <u>T</u> hioesterase
ISSR	=	<u>I</u> nter <u>S</u> imple <u>S</u> equence <u>R</u> ep <u>e</u> at
KASIII	=	Beta- <u>K</u> etoacyl- <u>A</u> CP <u>S</u> ynthase III
KASII	=	Beta- <u>K</u> etoacyl- <u>A</u> CP <u>S</u> ynthase II
FAD3	=	<u>O</u> mega-3 <u>F</u> atty <u>A</u> cid <u>D</u> esaturase
FAD6	=	<u>O</u> mega-6 <u>F</u> atty <u>A</u> cid <u>D</u> esaturase
PCR	=	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PICs	=	<u>P</u> olymorphic <u>I</u> nformation <u>C</u> ontents
RAPD	=	<u>R</u> andom <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> N <u>A</u>
RFLP	=	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
SAD	=	<u>S</u> tearoyl- <u>A</u> CP <u>D</u> esaturase
SPAR	=	<u>S</u> ingle <u>P</u> rimer <u>A</u> mplification <u>R</u> eaction
SRAP	=	<u>S</u> equence <u>R</u> elated <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphism
SSCP	=	<u>S</u> ingle <u>S</u> trand <u>C</u> onformation <u>P</u> olymorphism
SSR	=	<u>S</u> imple <u>S</u> equence <u>R</u> ep <u>e</u> at
STR	=	<u>S</u> hort <u>T</u> andem <u>R</u> ep <u>e</u> at
T _a	=	annealing temperature
T _m	=	melting temperature

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสบู่ดำ

Development of Microsatellite Markers for *Jatropha curcas* L.

คำนำ

ในสภาวะปัจจุบัน พลังงานถือเป็นเรื่องที่เชื่อมโยงระหว่างเศรษฐกิจและสังคมของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ดังปรากฏให้เห็นอย่างต่อเนื่อง เช่น การเกิดวิกฤตการณ์น้ำมันที่ผ่านมา มีผลกระทบโดยตรงต่อเศรษฐกิจ และสังคมของประเทศไทยมาก เนื่องจากประเทศไทยต้องนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงเกือบทั้งหมด ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราในการนำเข้าน้ำมันดิบปีละหลายแสนล้านบาท และเพิ่มขึ้นทุกปี เช่น ในปี พ.ศ. 2547-2551 ได้มีการนำเข้าน้ำมันดิบเป็นมูลค่า 248,638.0, 684,952.2, 772,054.5, 709,216.0 และ 1,002,211.3 ล้านบาท ตามลำดับ รวม 5 ปี ประเทศไทยต้องสูญเสียเงินในการนำเข้าน้ำมันดิบถึง 3,417,072.0 ล้านบาท (<http://www.ops2.moc.go.th/tradeth/cgi/ImCountry2.asp>) ทำให้เกิดผลกระทบต่อเศรษฐกิจภายในประเทศอย่างมาก มีผลทำให้ต้องหาพลังงานทดแทนจากพืช มาแทนพลังงานฟอสซิลที่มีราคาสูง และกำลังจะหมดไปในอนาคต

เนื่องจากประเทศไทยถือเป็นประเทศเกษตรกรรม ดังนั้นพลังงานทดแทนที่ได้จากพืช น่าจะมีศักยภาพต่อการพัฒนาประเทศในอนาคต ในบรรดาพืชพลังงานทดแทนที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลนั้น พบว่า สบู่ดำเป็นหนึ่งในพืชน้ำมันที่มีศักยภาพ และน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีให้แก่เกษตรกร เนื่องจากน้ำมันสบู่ดำสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซล โดยที่ไม่ต้องผสมน้ำมันชนิดอื่น และน้ำมันไม่มีผู้นำมาบริโภค จึงไม่ต้องแข่งขันในเรื่องราคากับพืชอื่น (สมบัติ, 2549) อีกทั้งยังปลูกง่ายหาได้ง่ายตามชนบท และทั่วทุกภูมิภาค ทนทานต่อสภาพดินที่อุดมสมบูรณ์ต่ำ ทนแล้ง และโตเร็ว สบู่ดำจึงเป็นพืชที่น่าสนใจโดยเฉพาะในสภาวะปัจจุบันที่น้ำมันดีเซลมีราคาสูง สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นพืชกลุ่มเดียวกับยางพารา มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลาง และประเทศเม็กซิโก นำเข้ามาในประเทศไทยโดยพ่อค้าชาวโปรตุเกสเพื่อนำเมล็ดไปอัดบีบน้ำมันมาทำสบู่ และใช้จุดไฟให้แสงสว่างในเวลากลางคืน สบู่ดำมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่นภูมิภาค เช่น ภาคเหนือ เรียก มะหุ้งฮั่ว ภาคอีสาน เรียก มะเข่า หรือ สีหลอด ส่วนภาคใต้ เรียก หงเทศ หรือ มาเคาะ (พรชัย, 2549) ยางจากก้านใบ มีรสฝาด ใช้ผสมเกลือกวาดปากเด็กแก้ลิ้นเปื่อยพุพอง รักษาโรคปากนกกระจอก สมานแผล ห้ามเลือด แก้ปวดฟัน แก้ลิ้นเป็นฝ้าขาวในเด็ก โดยผสมน้ำมันมะรดาป้ายลิ้น ลำต้นคั้นน้ำคั้นแก้ซางตานขโมย หรือ แขน้ำอาบแก้โรคผื่นคัน มีสารไฮโดรไซยานิก (hydrocyanic) ซึ่งมีกลิ่นเหม็นเขียว จึงนิยมปลูก

ทำเป็นแนวรั้ว ป้องกันสัตว์เลื้อยไม่ให้เข้าไปทำลายแปลงพืชผล (ปรัชญา, 2537) น้ำมันสามารถใช้บำรุงรากผม มีสารพิษที่เรียกว่า curcin และสารพวก resin เจือปนอยู่ หากบริโภคจะทำให้ท้องเดิน และเสียชีวิต จึงใช้ทำยาฆ่าแมลง กากเมล็ดที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน มีปริมาณไนโตรเจนสูง ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการ จึงนิยมใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ และสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้อีกด้วย

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรม และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืช และสัตว์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากการศึกษาในระดับโมเลกุล มีทั้งที่เป็นเครื่องหมายที่มีการข่มสมบูรณ (dominant marker) และเครื่องหมายที่มีการข่มร่วม (co-dominant marker) พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) จัดเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการข่มร่วม และศึกษากันมากในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ลำดับเบสเบสไมโครแซทเทลไลท์เป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกัน เรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วย 1-6 เบส ชุดที่ซ้ำกันนี้ จะอยู่ติดกันแบบหัวต่อหาง ส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สุรินทร์, 2545) ส่วนมากพบในบริเวณที่ไม่ใช่รหัสในการสร้างโปรตีน (non coding region) (Paniego *et al.*, 2001) และพบกระจายทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างฮอโมไซโกต (homozygote) กับเฮเทอโรไซโกต (heterozygote) ได้ ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์มีอัตราการกลายสูงกว่าลำดับเบสทั่ว ๆ ไป โดยการกลายของไมโครแซทเทลไลท์มักเกิดจากการเพิ่มขึ้น หรือ ลดลงของจำนวนชุดซ้ำ มีวิธีการตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) กับลำดับเบสด้านข้างของลำดับเบสซ้ำ (flanking sequence) และเพิ่มปริมาณในตำแหน่งที่แน่นอน เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ทำได้ง่าย และรวดเร็ว (Weber and May, 1989) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาจำเป็นต้องทราบลำดับเบสของจีโนมก่อน เพื่อออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ การทำแผนที่จีโนม เช่น ข้าว (Panaud and Chen *et al.*, 1996) และถั่วแดง (Gaitan-Solis *et al.*, 2002) เป็นต้น การจำแนกพันธุ์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ลูกผสม เช่น การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ และความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (ณัญญา, 2545) และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (นฤมล และคณะ, 2547) การปรับปรุงพันธุ์พืชต่าง ๆ เช่น การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์คัดเลือกพริกลักษณะต้านทานโรค (อรรธน์, 2542) การศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganai, 2002) แต่ยังไม่มีการศึกษากับสับปะรดในประเทศไทย เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นงานด้านรวบรวมพันธุ์ ขยายพันธุ์ เขตกรรม และการศึกษาด้านผลผลิต

เนื่องด้วยในหลายพื้นที่ของประเทศไทยเริ่มมีการปลูกสับดูอย่างจริงจัง และมีโครงการจะปรับปรุงพันธุ์ของสับดู จึงมีการนำพันธุ์จากต่างประเทศเข้ามา เพื่อปลูกทดสอบผลผลิตปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ เพื่อเพิ่มผลผลิต แต่ข้อมูลทางพันธุกรรมของสับดูมีน้อยมาก การตรวจสอบพันธุกรรมสับดูในประเทศไทยเบื้องต้นนั้น พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างต่ำ จึงต้องการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้สูง เช่น เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ รวมทั้งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอื่นร่วมด้วย เช่น เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน เพื่อใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับดูที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ และที่ปลูกกระจายอยู่ในประเทศไทยว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบพันธุ์เพื่อประโยชน์ในการรับรองพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และพัฒนาพันธุ์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับสุนัขดำ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในการตรวจสอบพันธุ์สุนัขดำทั้งในประเทศ และต่างประเทศ เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น เช่น เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน



การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลทั่วไปของสบู่ดำ

สบู่ดำมีชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า physic nut หรือ purging nut ภาษาโปรตุเกส เรียกว่า purgueira ชื่อทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำคือ *Jatropha curcas* L. มาจากภาษากรีก ซึ่งเป็นคำรวมของ คำว่า Jatro แปลว่า “หมอ” และ Trophe แปลว่า “อาหาร” (พรชัย, 2549) แต่คนไทยพื้นที่ภาคกลาง เรียกชื่อพืชนี้ว่า “สบู่ดำ” เนื่องจากเปลือกเมล็ดมีสีดำ และเวลาที่หักลำต้น หรือ กิ่งของต้นสบู่ดำ จะมีน้ำยางสีขาวไหลออกมา และมีลักษณะลื่นคล้ายสบู่ สบู่ดำมีถิ่นกำเนิดที่ประเทศเม็กซิโก และทางตอนเหนือของทวีปอเมริกากลาง เนื่องจากผลการเปรียบเทียบพรรณไม้แห้ง (herbarium specimens) ของสบู่ดำ พบว่าตัวอย่างสบู่ดำจากประเทศเม็กซิโก และทางตอนเหนือของทวีปอเมริกากลาง มีความใกล้เคียงกับสบู่ดำพันธุ์ดั้งเดิมมากที่สุด ต่อมา มีการแพร่กระจายพันธุ์ไปยังฝั่งทะเลแคริบเบียน และอเมริกาได้อย่างรวดเร็ว มีข้อสันนิษฐานว่าพ่อค้าชาวโปรตุเกสเดินเรือไปในทวีปอเมริกากลาง และนำต้นสบู่ดำเข้ามาในทวีปเอเชีย และทวีปแอฟริกา (Heller, 1996)

สำหรับในประเทศไทย สบู่ดำถูกนำเข้ามาในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา ชาวโปรตุเกส นำมาปลูกเพื่อต้องการรับซื้อเมล็ดไปหีบน้ำมันสำหรับทำสบู่ ปัจจุบันสบู่ดำมีปลูกอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น ภาคกลาง เรียกว่า สบู่ดำ ภาคเหนือ เรียกว่า มะหุ้งฮั่ว (ละหุ้งฮั่ว) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียกว่า มะเข่า หรือ สีหลอด และภาคใต้ เรียกว่า มาเคาะ หรือ หงเทศ (มะหงเทศ) (ชำนาญ, 2549)

สบู่ดำเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ จัดอยู่ในวงศ์ (family) Euphorbiaceae นับเป็นวงศ์ที่ใหญ่วงศ์หนึ่งของพืชดอก สามารถจำแนกได้ประมาณ 300 สกุล และ 7,500 ชนิด (<http://www.euphorbia-international.org>) พืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันกับสบู่ดำ ได้แก่ ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.) และละหุ้ง (*Ricinus communis*) เป็นต้น พบพืชในสกุล *Jatropha* ที่มีอยู่ในประเทศไทย ได้แก่ สบู่แดง หรือ สบู่เลือด (*Jatropha gossypifolia* Linn.) เข็มปัดดาเวีย (*Jatropha integerrima* Iacq.) หนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica* Hook.) และฝิ่นต้น (*Jatropha multifida* Linn.)

สามารถจำแนกอนุกรมวิธานของสับดูดำตามระบบฐานข้อมูล ITIS (The Integrated Taxonomic Information System) (<http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt>, 2010) ดังนี้

Scientific name:	<i>Jatropha Curcas</i> L.
Common name:	Physic nut, Purging nut
Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Subclass	Rosidae
Order	Euphorbiales
Family	Euphorbiaceae
Subfamily	Crotonoideae
Tribe	Jatrophaeae
Genus	<i>Jatropha</i>
Species	<i>Jatropha Curcas</i> Lin

การศึกษาทางพันธุศาสตร์เซลล์ของสับดูดำ จากการทำแคโรไทป์ (karyotype) โดยใช้ปลายราก พบว่า โครโมโซมของสับดูดำมีขนาดเล็ก จำนวนโครโมโซม $2n = 22$ สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เมทาเซนตริก และซับเมทาเซนตริก มีความยาวตั้งแต่ 1.71-1.24 ไมโครเมตร ภายในนิวเคลียสมีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 0.85 พิโคกรัมต่อดีพลอยด์ (2C DNA content) และมีขนาดจีโนมประมาณ 0.146×10^9 คู่เบส ต่อแฮพลอยด์ (1C DNA content) ประกอบด้วยเบสกวีนีนกับไซโทซีน 38.7 เปอร์เซ็นต์ และเบสอะดีนีนกับไทมีน 61.3 เปอร์เซ็นต์ (Carvalho *et al.*, 2008)

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสมุนไพร

ลักษณะทั่วไปเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง มีกิ่งจำนวน 7-10 กิ่งต่อต้น มีช่วงชีวิตไม่น้อยกว่า 20 ปี ความสูงประมาณ 6 เมตร ทรงพุ่ม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เมตร ยอด และใบอ่อนมีสีม่วงแกมเขียว ลำต้นส่วนที่อายุน้อยจะมีสีเขียว ผิวเรียบ อวบน้ำ เปราะหักง่าย เพราะเป็นไม้เนื้ออ่อน และไม่มีแก่น เมื่อมีอายุมากขึ้นโคนต้นมีสีน้ำตาลอมเทา ส่วนใหญ่ลำต้นจะเริ่มแตกพุ่มเมื่อมีความสูงเหนือระดับพื้นดินประมาณ 12 -15 เซนติเมตร โดยมีกิ่งแตกแขนงออกทางด้านข้าง (ชำนานู, 2549) น้ำยางมีลักษณะใส พบมากในส่วนของลำต้นอ่อน และก้านใบ ส่วนลำต้นแก่พบยางเฉพาะที่เปลือกเท่านั้น (ระพีพันธุ์ และสุขสันต์, 2525) เมื่อถูกผิวหนัง หรือ เสื้อผ้าจะเกิดรอยเปื้อนสีดำ หรือ สีน้ำตาลปนแดง ล้างออกยาก (นรินทร์, 2526) รากสมุนไพรที่งอกจากเมล็ดจะมีรากแก้ว และรากแขนง (lateral or secondary root system) สำหรับการขยายพันธุ์โดยการปักชำจะมีระบบรากแขนงเท่านั้น (Kobilke, 1989) รากมีลักษณะแผ่กระจายออกไปตามแนวรัศมีทรงพุ่ม และตามแนวดิ่ง ส่วนประกอบของสมุนไพร (ภาพที่ 1 A-E) มีดังนี้

ใบ เป็นใบเดี่ยว (simple leaf) เรียงสลับ รูปร่างแบบรูปหัวใจกว้าง หรือ รูปโล่ (orbicular-cordate or broadly ovate) คล้ายใบฝ้าย ใบพุดตาล แต่หนากว่าเพราะมีไข (cutin) เคลือบอยู่ที่ผิวใบ ขอบใบมีลักษณะเรียบ (entire) มีรอยหยัก (lobe) ตื้น ๆ ประมาณ 3-5 หยักฐานใบเป็นแบบรูปหัวใจ (cordate: heart-shaped) ปลายใบเป็นติ่งหนาม (mucronate) ยกเว้นปลายใบตรงตำแหน่งรอยหยักตรงกลางแบบแหลม (acute) การจัดเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบร่างแห (palmately netted) มีเส้นใบ 5-7 เส้น ตรงเส้นใบมีขนอ่อนปกคลุมอยู่ สีของใบเป็นสีเขียวเข้ม ขนาดของแผ่นใบ มีความยาวประมาณ 16.00-19.78 เซนติเมตร และมีความกว้างประมาณ 16.67-18.00 เซนติเมตร ใบสมุนไพรมีส่วนของก้านใบเชื่อมติดกับลำต้น ก้านใบมีสีเขียว ความยาวก้านใบเฉลี่ยประมาณ 24.00-24.47 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.56-0.66 เซนติเมตร ตำแหน่งของการเกิดของใบจะเกิดสลับกัน (alternate) ใบสมุนไพรจะทิ้งใบในฤดูแล้ง และเมื่อแล้งจัดจะทิ้งใบหมดต้น (ระพีพันธุ์ และสุขสันต์, 2525)

ดอก พบบริเวณซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ลักษณะเป็นช่อดอกแบบช่อกระจุกซ้อน (compound dichasia) หรือ มีการเรียงตัวของดอกย่อยแบบ panicle ดอกย่อยแยกเพศ ประกอบด้วย ดอกเพศผู้ และดอกเพศเมีย อยู่แยกกัน แต่อยู่ภายในช่อดอกเดียวกัน (monoecious) เป็นดอกไม้สมบูรณ์เพศ แต่อาจมีดอกสมบูรณ์เพศเกิดขึ้นได้ (hermaphrodite flowers) (Dehgan and Webster, 1979) ลักษณะ

ของดอกเพศผู้ และดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยง และกลีบดอก อย่างละ 5 กลีบเท่า ๆ กัน มักออกเป็นคู่ ๆ ซอยาวประมาณ 12 เซนติเมตร และก้านช่อดอกยาวประมาณ 6 เซนติเมตร

ดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉก รูปไข่ สีเหลืองแกมเขียวกว้าง 1.5 มิลลิเมตร และยาว 3 มิลลิเมตรโดยประมาณ ปลายกลม ด้านในมีขนยาว มีต่อมน้ำหวานที่โคนกลีบด้านใน มีเกสรเพศผู้ 10 อัน แบ่งออกเป็น 2 วง วงนอกแยกจากกัน วงในเชื่อมติดกัน อับเรณูยาว 1.5 มิลลิเมตร สีเหลือง นอกจากนี้มีการศึกษารูปร่างละอองเรณูของสับดูดำ พบว่าเป็นละอองเรณูเดี่ยว (monad) รูปร่างกลม (spheroidal) ขนาดใหญ่ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 57-78 ไมครอน ไม่มีโครงสร้างของช่องเปิดที่ชัดเจน (inaperture) ควบคุมบนผนังเรณูเป็นแบบ croton pattern (ยุพดี และคณะ, 2550)

ดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าดอกเพศผู้ อยู่บริเวณกลางของช่อย่อย กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉกยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร ลักษณะคล้ายดอกเพศผู้ กลีบดอกมี 5 กลีบ สีเขียวอ่อน ฝังไขเหนียวกลีบ (superior ovary) เป็นรูปกระสวยมี 3 พู ปลายก้านมียอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 2 แฉก อัตราส่วนดอกเพศผู้ : ดอกเพศเมีย ประมาณ 7:1 ปริมาณของดอกย่อย ประมาณ 70-100 ดอก ต่อช่อ แต่ละช่อติดผล 7-15 ผลเท่านั้น (อนุวัฒน์, 2548)

ผล มีรูปร่างค่อนข้างกลม หรือ เป็นรูปกระสวย กว้างประมาณ 2-3 เซนติเมตร และยาวประมาณ 2.5-3.5 เซนติเมตร ลักษณะเปลือกแข็ง (nut) มี 3 พู ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำเมื่อแก่จัด เปลือกผลแห้งที่ยังติดอยู่บนต้นจะไม่แตกออก (indehiscent fruit) แต่เมื่อร่วงสู่พื้นดินอาจแตกได้ จัดเป็นผลแบบ locucidal capsule คือ ผลแห้งจะแตกตามแนวกลางพู ผลสดหนึ่งผลมีน้ำหนักประมาณ 14.0-15.1 กรัม ผลแห้งน้ำหนักจะลดลงเหลือ 2.6-3.0 กรัม ผลแก่เมื่อแกะผนังด้านนอก (exocarp) และผนังชั้นกลาง (mesocarp) ออก จะพบผนังชั้นใน (endocarp) สานกันเป็นชั้นหุ้มเมล็ดไว้ภายในอีกชั้นหนึ่ง ผลมีจำนวน 3 เมล็ด อายุของผลสับดูดำตั้งแต่ออกดอกถึงผลแก่ประมาณ 60-90 วัน (พรชัย, 2549)

เมล็ด รูปร่างป้อมยาว (oblong) รูปกระสวยแบนข้าง ขนาดเมล็ดมีความกว้างประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร และความยาวประมาณ 1.70-1.94 เซนติเมตร มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ มีลักษณะเป็น albuminous seed โดยมี albumin บ่อยู่ภายในเป็นที่เก็บสะสมน้ำมัน และสารพวก curcin ส่วนของเนื้อใน (endosperm) และเอ็มบริโอ (embryo) มีสีขาว แต่ละเมล็ดมีน้ำหนักประมาณ

0.60-0.64 กรัม (ชานาญ, 2549) เมล็ดสบู่ดำมีปริมาณน้ำมัน 35-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเมล็ด (สุรพงษ์, 2549)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ (A) ลำต้น (B) ใบ (C) ดอก (D) ผล และ (E) เมล็ด

3. การขยายพันธุ์ การเพาะปลูก และเก็บเกี่ยวผลผลิต

สบู่ดำสามารถขยายพันธุ์ได้ 2 วิธี ดังนี้

1. การเพาะเมล็ด เมล็ดสบู่ดำไม่มีระยะพักตัว จึงสามารถเพาะเมล็ดได้ทุกฤดูกาล สำหรับต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ด จะให้ผลผลิตได้ประมาณ 8-10 เดือนหลังการปลูก สามารถหยอดเมล็ดลงในหลุมปลูกโดยตรง หรือ แช่เมล็ดในน้ำ 1 คืน ก่อนปลูกในถุงเพาะ หรือ กระบะทราย โดยใช้ดินผสมที่มีสัดส่วนของดินทราย แกลบเผา และปุ๋ยคอก เมื่อต้นสบู่ดำอายุประมาณ 2 เดือน จึงนำไปปลูกลงแปลง (นันทวรรณ, 2549; รัช, 2549)

2. การปักชำ ต้องคัดท่อนพันธุ์ที่มีสีเขียวปนน้ำตาลเล็กน้อย ซึ่งเป็นกิ่งอ่อนครั้งแก่ (semi hardwood) มีตาประมาณ 3-5 ตา หรือ ความยาวประมาณ 5-7 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางไม่ควรเกิน 1.0-1.5 เซนติเมตร นำมาปักลงในถุงเพาะ หรือ กระบะทราย ใช้เวลาปักชำประมาณ 1 เดือนจึงนำไปปลูกในช่วงต้นฤดูฝน การปลูกวิธีนี้จะใช้เวลา 4 เดือน จะเริ่มออกดอก ระยะเวลา

ตั้งแต่ ออกดอกจนถึงเมล็ดแก่สีดำประมาณ 60-90 วัน ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ (ระพีพันธุ์ และ สุขสันต์, 2525) นอกจากนี้ วิฑูรย์ (2551) รายงานว่าสามารถปลูกโดยใช้กิ่งสับขนาด 5 เซนติเมตร พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าการปลูกด้วยเมล็ดโดยตรง

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสับดำ โดยใช้ชิ้นส่วนของตายอด ตาข้าง ใบอ่อน ก้านใบ และลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.01-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเนื้อเยื่อชิ้นส่วนต่าง ๆ สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี และอาจเพิ่มโพรลีน (proline) หรือ เคซีน (casein) ความเข้มข้น 300-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะช่วยให้มีการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก โดยไม่เกิดแคลลัส (ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์, 2550)

สภาพพื้นที่ปลูกที่เหมาะสมของสับดำ ควรเป็นดินร่วน มีธาตุอาหารอุดมสมบูรณ์ แต่มีข้อควรระวัง คือ สับดำเป็นพืชที่ไม่ทนต่อดินที่มีน้ำขัง ดังนั้นพื้นที่ที่เหมาะสมจึงต้องมีการระบายน้ำดี (สมบัติ, 2549) นอกจากนี้สับดำสามารถเจริญเติบโตในสภาพพื้นที่ดินไม่เหมาะสม และมีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ เช่น ดินเค็ม (saline soil) ดินทราย (sandy soil) และดินที่มีหินมาก (stony soil) (Lele, 2005) นอกจากนี้ฤดูกาลปลูก บางพื้นที่เริ่มจากช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม แต่ที่เหมาะสมควรเป็นเดือนพฤษภาคม เพราะเป็นช่วงต้นฤดูฝน

การเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยเลือกผลสับดำเริ่มแก่ ซึ่งจะเป็นสีเหลือง สามารถเก็บทุก 2-3 สัปดาห์ ในแต่ละข่อมี 4-14 ผล อ่อนแก่ไม่พร้อมกันจึงต้องทยอยเก็บ กรณีต้นสูงอาจใช้วิธีเขย่ากิ่งให้ผลร่วงลงดินแล้วตามเก็บ

4. การผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์

ในแง่ของการผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ พบว่าสับดำเป็นพืชผสมข้ามดอก หรือ ข้ามต้น โดยอาศัยลม หรือ แมลงในการนำละอองเกสร เวลาบานของดอกเป็นสิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาในการผสมพันธุ์ ช่วงเวลาที่ละอองเรณูของสับดำปล่อยจากอับเรณู (pollen shed) ตั้งแต่เวลา 8.00-10.00 นาฬิกา และช่วงเวลาที่เกสรเพศเมียพร้อมที่จะได้รับการผสมเกสร ตั้งแต่เวลา 9.00 -10.00 นาฬิกา พบว่าความมีชีวิตของละอองเรณูสับดำ 92 เปอร์เซ็นต์ และมีความออก 22.55 เปอร์เซ็นต์ (วัลชลีย์, 2527) ดอกสับดำจะบานเวลาเช้า ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ดอกเพศผู้จะบานก่อนดอกเพศเมีย และดอกเพศผู้มีปริมาณมากกว่าดอกเพศเมียมาก ทำให้ได้ผลผลิตอยู่ใน

เกณฑ์ต่ำ นอกจากนี้สับดูดยังมีผล และเมล็ดขนาดเล็ก ทำให้ได้น้ำมันน้อย ดังนั้นการผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ และเพิ่มผลผลิตจึงควรเน้นในเรื่องนี้ โดยทำให้เปอร์เซ็นต์ดอกเพศเมียเพิ่มมากขึ้น หรือ จำนวนผลมากขึ้น ขนาดผล หรือ เมล็ดใหญ่ขึ้น การออกดอก และแก่เร็วขึ้น เป็นต้น

5. การสกัดน้ำมัน และองค์ประกอบของกรดไขมันในสับดูดย

การสกัดน้ำมันสับดูดยสามารถทำได้โดยบดสับดูดยให้ละเอียด อาจใช้ทั้งเมล็ด เมล็ดรวม เปลือก และเนื้อเมล็ด แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ หรือ เฮกเซน เป็นต้น (ไพโรจิตร และคณะ, 2525) ปัจจุบันมีการวิเคราะห์คุณสมบัติ และองค์ประกอบทางเคมีของสับดูดยอย่างกว้างขวาง เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของสับดูดยโดยประมาณ พบว่ามีกรดไขมัน 2 ประเภท คือ กรดไขมันอิ่มตัว 21.9 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย palmitic acid (C16:0) 14.4 เปอร์เซ็นต์ และ stearic acid (C18:0) 7.5 เปอร์เซ็นต์ กรดไขมันอีกประเภทหนึ่งที่พบในน้ำมันสับดูดย คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณ 78.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ประกอบด้วย oleic acid (C18:1) 44.5 เปอร์เซ็นต์ และ linoleic acid (C18:2) 32.9 เปอร์เซ็นต์ (กล้านณรงค์ และคณะ, 2547) ปริมาณกรดไขมันจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสับดูดย

นอกจากนี้ยังพบกรดไขมัน myristic acid (C14:0) arachidic acid (C20:0) eicosamonoenoic acid (C20:1) eicosadienoic acid (C20:2) behenic acid (C22:0) ซึ่งพบในปริมาณน้อยประมาณ 0.1-4.7 เปอร์เซ็นต์

6. ความเป็นพิษของสับดูดย

ทุกส่วนของสับดูดยมีสารพิษที่เป็นอันตราย เช่น ลำต้น ใบ และ ผล มีสารไฮโดรไลซายนิก เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำให้คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ชัก หอบ หายใจขัด และอาจตายได้ ส่วนน้ำมันและกากน้ำมันของสับดูดย มีสารพิษหลายชนิด เช่น phorbol ester เป็น ester ของ tiglane diterpene (Gubitz, 1999) tiglane เป็น tetracyclic diterpene เมื่อเกิดปฏิกิริยา hydroxylation จะมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) เข้าจับกับสาร tiglane ที่ตำแหน่งต่าง ๆ เกิดเป็นสารประเภทแอลกอฮอล์ เมื่อสารนี้รวมกับกรด ก็จะเกิดเป็นสารประเภทเอสเทอร์ เรียกว่าเป็นพวก phorbol ester น้ำมันสับดูดยพบว่า ประกอบด้วย phorbol ester อย่างน้อย 4 ชนิด (Haas, 2002) ซึ่งสูตรโครงสร้างของ phorbol ester หลักที่พบคือ 12-deoxy-16-hydroxyphorbol-4'-[12',14'-butadienyl]-6'-[16',18',20'-nonatrienyl]-bicyclo [3.1.0] hexane-(13-0)-2' [carboxylate]-(16-0)-3'-[8'-butenoic-10'] ate หรือ

DHPB ซึ่งจะมีความเข้มข้นภายในเมล็ดสูงถึง 3.85 มิลลิกรัม เป็นสารพิษที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในแง่ของการส่งเสริมให้เกิดเนื้องอก (tumor promotion) คือ ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง แต่สามารถ กระตุ้นให้ยีนในเซลล์ผิดปกติได้ ทำให้เกิดการอักเสบ การบวมของผิวหนัง เป็นต้น (Adolf, 1984) มีการศึกษาการลด phorbol ester จากน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้สารดูดซับ 5 ชนิด คือ ถ่านกัมมันต์ แป้งฟอกสีเบอร์ 150 แป้งฟอกสีเบอร์ 200 โคลดิน และไคโตซาน พบว่า แป้งฟอกสีเบอร์ 200 มีความสามารถในการดูดซับสาร phorbol ester ได้ดีที่สุด (รยากร และคณะ, 2550) นอกจากนี้ ยังพบสารพิษ curcin มีฤทธิ์เหมือนสลด เมื่อรับประทานเข้าไปแล้ว จะทำให้ท้องเดิน และเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ แต่สามารถสลายพิษได้ด้วยความร้อน รวมทั้งยังมีสารประกอบที่ไม่มีประโยชน์ในการบำรุงร่างกาย (antinutrient) เช่น trypsin inhibitor, lectin และ phytate พบในปริมาณที่สูง และเป็นสารพิษที่มีผลทำให้เกิดอันตรายขึ้น หากสัมผัสเป็นระยะเวลานาน ๆ (Marker *et al.*, 2008; Achten *et al.*, 2008)

7. ประโยชน์ของสบู่ดำ

ประโยชน์ของสบู่ดำใช้เป็นรั้วป้องกันสัตว์ เข้ามาทำความเสียหายต่อพืช เนื่องจากสารพิษพวกไฮโดรไซยานิก มีกลิ่นเหม็นเขียว ใช้กันลมร้อนในหน้าแล้ง ลดการระเหยของน้ำในแปลงผักของชาวอินเดีย และเป็นแนวกันไฟ นอกจากนี้ยังใช้เป็นเสาค้ำของพืชวานิลลาในประเทศมาดากัสการ์ ของทวีปแอฟริกา ปลุกแซมระหว่างต้นสมุนไพรร เพื่อขับไล่แมลงศัตรูพืช ป้องกันการชะล้างของดิน (soil erosion) เนื่องจากระบบรากดิน แพร่กระจายดี และรักษาความสมบูรณ์ของดิน สบู่ดำสามารถปลูกเพื่อบำบัดของเสียในสภาพแวดล้อมได้ เนื่องจากเจริญเติบโตในพื้นที่ปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น สารหนู โครเมียม และสังกะสี (Diaollo, 1994) ได้

ใบ: ใช้เป็นยาถอนพิษแก้ตัวร้อน แก้พิษตานซาง แก้ลมเป็นไข้ แก้ปาก และลิ้นเปื่อยพุพอง รักษาบาดแผลจากแมลงกัด และต่อย (Watt and Brandwijk, 1962; Schmook and Serralta, 1997) ยางจากใบมีเอนไซม์ curcain ซึ่งเป็น proteolytic enzyme ช่วยในการรักษาบาดแผล (Nath and Dutta, 1997) รักษาโรคปวดตามข้อ และตามกล้ามเนื้อ (Rheumatism) (Chhabra *et al.*, 1990) ใบ และยอดอ่อน เมื่อนำไปนึ่งด้วยไอน้ำร้อน สามารถนำมารับประทานได้ (Duke, 1985)

ราก: ใช้เป็นยารักษาโรค เช่น ปวดบวม และซิฟิลิส เป็นต้น (Chhabra *et al.*, 1990)

เปลือก และลำต้น: สามารถใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ ซึ่งสามารถเพิ่มผลผลิตของข้าวได้ถึง 11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการไม่ใส่ปุ๋ย เนื่องจากมีสารประกอบไนโตรเจนสูง (Sherchan *et al.*, 1989)

ใช้เปลือก และกากน้ำมันสบู่ดำหมักในสภาพไร้อากาศจะได้แก๊สชีวภาพ เช่น มีเทน 70 เปอร์เซ็นต์ (Gubitz *et al.*, 1997) เปลือกของสบู่ดำให้สารแทนนินประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์ (Openshaw, 2000) ใช้เป็นยาถ่าย ยาขับหอนพยาธิ แก้ปวดท้อง น้ำสกัดจากเปลือก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และเป็นวัตถุดิบในการผลิตสีธรรมชาติได้โดยให้สีน้ำเงินเข้ม (ชำนาญ, 2549)

เมล็ด: ในประเทศเม็กซิโก นำเมล็ดมาคั่ว หรือ ต้มเพื่อสลายสารพิษ สามารถนำไปรับประทานได้ นอกจากนี้ กากเมล็ดสามารถผลิตเป็นอาหารสัตว์ (animal feed) หลังผ่านกระบวนการกำจัดสารพิษด้วยความร้อนร่วมกับการสกัดด้วยสารเคมี (Apone, 1978) น้ำมันจากเมล็ดสามารถแปรรูปเป็นเอทิล หรือ เมทิลเอสเทอร์เพื่อผสมกับน้ำมันดีเซลเป็นไบโอดีเซล หรือ ใช้ได้โดยตรงกับเครื่องยนต์ทางทะเล และน้ำมันหล่อลื่น หรือ ใช้เป็นน้ำมันบำรุงรากผสมสบู่เทียนไข และกลีเซอรินดิบ (Gubitz, 1998) นอกจากนี้ ในประเทศไทยสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ใช้ไขมันสบู่ดำในการจุดตะเกียง และนำเมล็ดมาตำให้ละเอียด หรือ นำเมล็ดมาเลียบด้วยโลหะ สามารถจุดให้แสงสว่างแทนเทียนไข และเทียนพรรษา (เผด็จ, 2552; ระพีพันธุ์ และสุขสันต์, 2525) สารสกัดจากไขมันสบู่ดำ สามารถใช้กำจัดศัตรูพืช เช่น หนอนเจาะสมอฝ้าย เป็นต้น (Mengual, 1997) และสกัดสารจากสบู่ดำด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบว่าสารพิษบางชนิดใช้ในการควบคุมพยาธิในหอยที่นำมาบริโภคได้ (Liu *et al.*, 1997)

8. เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Polymerase Chain Reaction) หรือ พีซีอาร์พัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1983 เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลาย ร่วมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของ ดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์ หรือ นำไปโคลน การทำพีซีอาร์ เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สซ้ำกันหลาย ๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอ ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ด้วย ดังนั้น จึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย และมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นข้อกำหนด ในการทำพีซีอาร์ คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบ ลำดับเบสทั้งหมด หรือ ทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ ในปฏิกิริยาต่อไป ทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาว เท่ากับ ชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง (สุรินทร์, 2545)

ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำคือสกัดดีเอ็นเอ ออกจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ คือออกซิไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อน แล้วลดอุณหภูมิ ลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย และ มีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่น ๆ มากมาย เข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สที่ใส่ลงใน ปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอ เป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมาย จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลาย ๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย จะเพิ่มขึ้นจนถึง 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (สุรินทร์, 2545)

9. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing analysis)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเทคนิคที่สำคัญสำหรับนักชีวโมเลกุล เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นข้อมูลที่ชัดเจน และเป็นเอกลักษณ์ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านชีววิทยาโมเลกุลได้อย่างกว้างขวาง วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มี 2 วิธี ได้แก่ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีทางเคมี (chemical sequencing) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีใช้เอนไซม์ (enzymatic sequencing) ในปัจจุบันมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (automated DNA sequencing) ใช้หลักการติดฉลากเบสของดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน แล้วนำเบสเหล่านี้เข้าไปแทรก (incorporate) ในสายดีเอ็นเอใหม่ โดยอาศัยดีเอ็นเอพอลิเมอเรส จากนั้นจึงนำไปเคลื่อนผ่านเจลที่มีความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า ด้วยหลักการอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำให้เกิดแถบสีของสารเรืองแสงเรียงกันตามลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะถูกรวบรวมด้วยเครื่องรับสัญญาณแสงแล้วแปลงเป็นสัญญาณดิจิทัล ส่งไปวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ โดยกระบวนการทั้งหมดจะเกิดขึ้นอย่างอัตโนมัติภายใต้การทำงานของเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencer) (http://bsu.biotech.or.th/sequencing_overview.php, 2010)

10. เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมาย (marker) ใช้เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณ และคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างระหว่าง และภายในสปีชีส์ ประชากร หรือ แต่ละตัวอย่าง (สุรินทร์, 2552; Kumar, 1999) มี 2 ประเภท ได้แก่

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นเครื่องหมายที่จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยใช้วิธีเปรียบเทียบจากลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะใบ ลำต้น และจำนวนเกสรเพศผู้ เป็นต้น ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้ อาจขึ้นกับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผิดพลาด บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ แต่อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางสัณฐานวิทยายังคงมีความสำคัญ เนื่องจากมีราคาถูก และใช้พิจารณาประกอบเครื่องหมายโมเลกุลอื่นได้

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular markers) เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน โดยแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมดูแถบโปรตีนด้วยสารที่จำเพาะ ข้อดีของเครื่องหมายโปรตีน คือ ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก และแถบของโปรตีนที่ปรากฏแสดงการข่มร่วมกัน (codominance) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบฮอโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ แต่ก็มีข้อจำกัด คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากนัก และการแสดงออกของยีนที่ศึกษาขึ้นอยู่กับ ชนิดเนื้อเยื่อ ระยะเวลา ระยะการเจริญเติบโต และอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้โปรตีนยังสูญเสียสภาพได้ง่าย ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้นาน จึงต้องวิเคราะห์ผลในระยะเวลาจำกัด อีกทั้งการตรวจสอบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีระดับต่ำเมื่อเทียบกับระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน และการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง อาจไม่มีผลต่อระยะการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนเมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีข้อดีกว่าการตรวจสอบด้วยโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นานกว่าเครื่องหมายโปรตีน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ ตรวจสอบได้ในเนื้อเยื่อใด ๆ ที่มีการเจริญเติบโต ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบได้ทั้งในส่วนที่เป็นยีน และไม่ใช่นิวคลีโอไทด์ หรือ ส่วนที่มีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ และครอบคลุมทั้งจีโนม มีวิธีการตรวจสอบมากมาย

11. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง และในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม หรือ ดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้ เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ เกิดภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ วิธีตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของดีเอ็นเอทำได้ โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552) หรือ ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงออกในรูปของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อาจทำได้โดยใช้วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization-based DNA marker) เช่น RFLP (Restriction Fragment Length-Polymorphism) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าสู่ของลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (Tanksley *et al.*, 1989) หรือ วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR-based DNA markers) เช่น RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (William *et al.*, 1990) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้น ๆ และ AFLP (Amplified Fragment Length- Polymorphism) มีการพัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตร ในปี ค.ศ. 1993 เป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณโดยอาศัยหลักการพีซีอาร์ เป็นต้น (Vos *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอตามลักษณะการข่ม เช่น เครื่องหมายที่มีการข่มสมบูรณ์ แสดงลักษณะมี และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เป็นฮอโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ ได้แก่ RAPD และ AFLP เป็นต้น เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษา โดยไม่มีความจำเป็นต้องรู้ข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาก่อน และศึกษาได้ครั้งละหลายตำแหน่ง (multilocus detection) ส่วนเครื่องหมายที่มีการข่มร่วม เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงการข่มร่วมกัน จึงสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เป็นฮอโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ ได้แก่ RFLP, SSR (Simple Sequence Repeat) หรือ Microsatellite และ SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) ซึ่งจำเป็นต้องมีข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ให้จำเพาะกับตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในจีโนม (singlelocus detection) เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช และสัตว์อย่างกว้างขวาง

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ค้นพบครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Alec John Jeffrey ในปี ค.ศ. 1984 โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งมีลักษณะเฉพาะในแต่ละบุคคล จำนวนซ้ำที่พบมีตั้งแต่ 2 ครั้งไปจนถึง 1,000 ครั้ง ซึ่งจำนวนซ้ำจะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล ทำให้เกิดเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือ แบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริโดเซชัน ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิม ได้จากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้ายแถบดีเอ็นเอไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์แล้วไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดฉลาก ซึ่งโพรบนี้อาจมาจากดีเอ็นเอส่วนที่จำเพาะกับยีน หรือ ที่เป็นมิโนแซทเทลไลต์ หรือ ไมโครแซทเทลไลต์ เกิดเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับแต่ละบุคคล แถบดีเอ็นเอมีลักษณะเหมือนแท่งแถบรหัส (bar code) ที่ใช้ในการกำหนดชนิดสินค้า ซึ่งมีความหมายเดียวกับ คำว่า DNA profiling หรือ DNA typing ในปัจจุบัน ยังหมายรวมถึง วิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบหลายตำแหน่งพร้อมกัน (multiplex PCR) โดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่มาวิเคราะห์ร่วมกัน หรือ แบบจำเพาะครั้งละหนึ่งตำแหน่ง (singlelocus PCR) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมนุษย์ในทางการแพทย์ (สุรินทร์, 2545; www.rm.ac.th/ranee/genome)

12. การจำแนกพันธุ์สับดูดำโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อใช้จำแนกพันธุ์ของสับดูดำ มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ทั้งทางด้านชนิดพันธุ์ของสับดูดำ และชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษา เช่น การใช้เครื่องหมาย AFLP ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับดูดำที่กระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ จากสถานที่ต่าง ๆ ในประเทศอินเดีย จำนวน 48 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 7 คู่ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 770 แถบ ซึ่งแบ่งเป็น polymorphic bands 680 แถบ คิดเป็น 88 เปอร์เซ็นต์ และ monomorphic bands 90 แถบ คิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ หาความสัมพันธ์ของสับดูดำจากบริเวณต่าง ๆ และจำแนกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.43-0.97 (Varshney *et al.*, 2009) การจัดกลุ่มสับดูดำจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศอินเดียด้วยเครื่องหมาย RAPD 20 ชนิด ร่วมกับเครื่องหมาย ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 25 ชนิด สามารถจัดกลุ่มสับดูดำเป็น 4 กลุ่ม เช่น Uttaranchal, Rajasthan, Orissa และ Uttar Pradesh ซึ่งมีความ

คล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.41-0.89 (Gupta *et al.*, 2008) นอกจากนี้ การใช้เครื่องหมาย SPAR (Single Primer Amplification Reaction) สามารถจำแนกตัวอย่างสบู่ดำที่รวบรวมจากสวนพฤกษชาติ และสถาบันวิจัยต่าง ๆ จำนวน 7 แห่ง ในประเทศอินเดียได้ (Ranadee *et al.*, 2008) ในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนก็ได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่รวบรวมจากสถานที่ต่าง ๆ จำนวน 38 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI*+3 และ *MseI*+3 จำนวน 9 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 246 แถบ มี polymorphic bands 72 แถบ คิดเป็น 27 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูง ระหว่าง 0.87-0.98 และได้สรุปว่า สบู่ดำตัวอย่างดังกล่าว น่าจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ จึงจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยใช้แหล่งพันธุกรรมของสบู่ดำจากต่างประเทศ เช่น ประเทศอินเดีย เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน (Shen *et al.*, 2010; Divakara *et al.*, 2010) นอกจากนี้ ในประเทศไทยยังมีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสบู่ดำจำนวน 134 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของสบู่ดำทั้งในประเทศ และต่างประเทศ เป็น 8 กลุ่ม มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม อยู่ระหว่าง 0.94-1.00 (ศิริศักดิ์, 2550)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำของประเทศอินเดีย กับสบู่ดำที่นำเข้ามาจากประเทศเม็กซิโก ซึ่งเป็นพันธุ์ไม่มีสารพิษ phobol ester หรือ มีปริมาณน้อยกว่ามาตรฐาน คือ 0.01 เปอร์เซ็นต์ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR พบว่า สามารถจำแนกสบู่ดำของประเทศอินเดีย และประเทศเม็กซิโกได้ นอกจากนี้ ยังมีการพัฒนาเครื่องหมาย โมเลกุล SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) จากแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะจากเครื่องหมาย RAPD และ ISSR ในสบู่ดำของประเทศอินเดีย และประเทศเม็กซิโกด้วย (Basha and Sujatha, 2007) มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี เช่น ปริมาณโปรตีนภายในเมล็ด น้ำมัน และ สารพิษ phorbol ester ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ RAPD, ISSR, SCAR และ SSR ศึกษาพันธุกรรมของสบู่ดำจากประเทศต่าง ๆ พบว่า สามารถจำแนกสบู่ดำพันธุ์มีพิษจากประเทศอินเดีย และไม่มีพิษ หรือ มีพิษน้อยจากประเทศเม็กซิโกออกจากกันได้ (Sujatha *et al.*, 2008) นอกจากนี้ การใช้เครื่องหมาย AFLP ในการจำแนกสบู่ดำจากมหาวิทยาลัย Osmania และสถาบัน International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics หรือ ICRISAT ที่รวบรวมจากสถานที่ต่าง ๆ ของประเทศอินเดีย เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ จำแนกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.43-0.79 (Tatikonda *et al.*, 2009)

นอกจากการเลือกใช้สับุ้ดำที่มีฐานพันธุกรรมต่างกันจากประเทศต่าง ๆ มาใช้ ในการปรับปรุงพันธุ์แล้ว ยังมีความพยายามพัฒนาพันธุ์โดยการผสมสับุ้ดำกับพืชต่างชนิด (interspecific hybridization) เพื่อขยายฐานพันธุกรรม และรวบรวมลักษณะดีจากพืชต่างชนิดไว้ใน สับุ้ดำพันธุ์ลูกผสม Pamidiamarri *et al.* (2008) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่าง พืชในสกุล *Jatropha* ได้แก่ *J. curcas*, *J. glandulifera*, *J. gossypifolia*, *J. integerrima*, *J. multifida*, *J. podagrica* และ *J. tanjorensis* ที่พบในประเทศอินเดีย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD และ AFLP พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.97-0.98 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ เครื่องหมายโมเลกุล RAPD และเมื่อพิจารณาพืชในสกุล *Jatropha* เฉพาะที่มีอยู่ในประเทศไทย 5 ชนิด ได้แก่ สับุ้แดง (*J. gossypifolia*) เข็มปัตตาเวีย (*J. integerrima*) หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*) และฝิ่นต้น (*J. multifida*) พบว่า ระหว่างสับุ้ดำกับเข็มปัตตาเวีย มีความคล้ายคลึง ทางพันธุกรรมมากที่สุด Sujatha and Prabakaran (2003) ประสบความสำเร็จในการผสมสับุ้ดำกับ เข็มปัตตาเวีย และยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD ได้ ลูกผสมจากการผสม ข้ามชนิด อาจแสดงความเป็นหมัน จึงมักมีการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ ได้แก่ จำนวนโครโมโซม การเข้าคู่กันของโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Divakara *et al.*, 2010) เพื่อเป็นข้อมูล พื้นฐานในการผสมกลับ (backcross) ไปยังสับุ้ดำ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สับุ้ดำให้ดีขึ้นต่อไป

13. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker)

ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำ ประกอบด้วย 1-6 เบส เรียงซ้ำติดต่อกันไป เรื่อย ๆ เป็นช่วงยาว ซึ่งชุดที่ซ้ำกันนี้จะอยู่ติดกันแบบหัวต่อหาง เช่น (A)_n, (CA)_n, (TCC)_n และ (GATA)_n เป็นต้น เมื่อ n คือ จำนวนชุดซ้ำ โดยมีจำนวนซ้ำ ตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไป และไม่เกิน 100 ซ้ำ พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งในจีโนมของโปรแคริโอต และยูแคริโอต (Arie *et al.*, 2000; Morgante *et al.*, 2002) จากการที่ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำขนาดสั้น ๆ และไม่ซับซ้อน จึงมีชื่อเรียกอื่นอีกว่า Simple Sequence Repeat (SSR) พบว่า ลำดับเบสแบบ ไมโครแซทเทลไลท์นี้มีการกระจายทั้งจีโนม แต่ไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณก็พบมาก บางบริเวณก็พบ น้อย ตามแต่นิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิต การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลท์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณ ที่ไม่ใช่อินtron หรือ ส่วนที่ไม่เข้ารหัสของยีน (noncoding region) (สุรินทร์, 2552)

ลักษณะของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท (Weber and May, 1990) ดังนี้

1. perfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่มีลำดับเบส 2 ตัว หรือ มากกว่า เรียงตัวซ้ำกัน ไปเรื่อย ๆ เช่น $(CA)_n$
2. compound repeat เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่มีลำดับเบสซ้ำหลายชนิดเรียงต่อกัน เช่น $(CA)_n(GT)_n$
3. imperfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่มีเบสอื่นเข้ามาแทรกในลำดับเบสซ้ำนั้น ซึ่งเกิดจากการกลาย เช่น $(CA)_n(N)_n(CA)_n$

เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์เป็นลำดับเบสที่มีอัตราการกลายสูงกว่า ลำดับเบสทั่ว ๆ ไป โดยการกลายของไมโครแซทเทลไลต์มักเกิดจากการเพิ่มขึ้น (insertion) หรือ การขาดหายไป (deletion) ของเบสในชุดซ้ำทั้งชุด ซึ่งต่างจากลำดับเบสทั่วไปที่มักเกิดจากการกลายแบบการแทนที่เบส (base substitution) การเพิ่มขึ้น หรือ ลดลงของชุดซ้ำมีกลไก 2 แบบ คือ การเลื่อนของสายดีเอ็นเอที่จับคู่กันขณะเกิดการจำลองโมเลกุล (slip-strand mispairing) หรือ เรียกว่าเกิด slippage (Levinson and Gutman, 1987) และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ไม่เท่ากัน (unequal crossingover) (Richard and Pâques, 2000)

หน้าที่ของไมโครแซทเทลไลต์ ยังไม่ทราบแน่ชัด พบไมโครแซทเทลไลต์บางชนิด ในบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และบางชนิดทำหน้าที่เป็นส่วน นำรหัสของยีนด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครแซทเทลไลต์บางชนิดทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น การแสดงออกของยีน (enhancer) โดยจับกับโปรตีนที่จำเพาะ ซึ่งความผันแปรของจำนวนชุดซ้ำ มีผลต่อการควบคุมการทำงานของยีน (Godldstein and Schlötterer, 1999) เนื่องจากลำดับเบสแบบ ไมโครแซทเทลไลต์เป็นลำดับเบสที่ไม่เสถียร มีอัตราการกลายสูง และมีกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม จึงมีการนำดีเอ็นเอส่วนนี้มาใช้ศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะ ในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganai, 2002)

การตรวจสอบดีเอ็นเอส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การทำ Southern blot hybridization โดยตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ย้ายแถบดีเอ็นเอสู่แผ่นเมมเบรน และไฮบริไดซ์กับโพรบที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ ซึ่งวิธีนี้จะตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลต์ โดยใช้โพรบแบบใดแบบหนึ่ง หรือ หลายแบบพร้อม ๆ กันได้ นอกจากนี้ยังสามารถดัดแปลงโดยใช้การสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์เพียงชนิดเดียวมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อเปรียบเทียบระยะระหว่างลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ที่เรียกว่า ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) ซึ่ง ISSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสใด ๆ ในจีโนมมาก่อน (สุรินทร์, 2549)

การวิเคราะห์ความหลากหลายของจำนวนชุดซ้ำบนไมโครแซทเทลไลต์ เป็นการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่ตำแหน่งจำเพาะ ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single locus marker) โดยการเพิ่มปริมาณส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับบริเวณลำดับเบสที่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ (flanking DNA) ทั้งสองด้าน แยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลพอลิอะครีลาไมด์ และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี หรือ ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารเคมี (Weber and May, 1989) ในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับเบสบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาก่อน (สุรินทร์, 2552)

วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์แบบดั้งเดิมนั้น จะใช้การเตรียมห้องสมุดจีโนม (genomic library) โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้มีขนาด 300-1000 คู่เบสแล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector) ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ และคัดเลือกโคลนโดยการไฮบริไดซ์กับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite probe) สกัดพลาสมิด เพื่อหาลำดับเบสที่อยู่ขนาบข้างกับไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ และออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากได้โคลนที่ให้ผลบวกจำนวนน้อย (He *et al.*, 2003) ในปัจจุบันการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่นิยมใช้มี 2 วิธี ได้แก่

1. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากข้อมูลลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์จากฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ เช่น NCBI (The National Center for Biotechnology Information), EMBL (The European Molecular Biology Laboratory) และ DDBJ (DNA Data Bank of Japan) ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และไม่เสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนา เนื่องจากเป็นข้อมูลสาธารณะ ซึ่งในปัจจุบันพบว่าข้อมูลของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จำนวนมาก อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อจำกัดในสิ่งมีชีวิตที่มีการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมแล้วเท่านั้น

2. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากห้องสมุดจีโนมด้วยวิธี enrichment โดยการตัดจีโนมยีสต์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวกับ adaptor เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และไฮบริดซ์ชิ้นดีเอ็นเอกับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วย magnetic bead ที่หุ้มด้วย streptavidin (Edwards *et al.*, 1996) ซึ่งหลังจากกำจัดดีเอ็นเอส่วนเกินออกไปแล้ว จะมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ 50-90 เบสก่อนจะเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะต่อไป (Butcher *et al.*, 2000) วิธีการ enrichment นี้มีประสิทธิภาพสูง และใช้เวลาในการพัฒนาน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม เพราะสามารถเพิ่มจำนวนโคลนที่ให้ผลบวกเป็นจำนวนมาก (Billotte *et al.*, 2001) จากข้อดีของวิธี enrichment จึงมีผู้ใช้วิธีนี้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เพื่อตรวจสอบสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวาง เช่น การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในถั่ว azuki ด้วยวิธี enrichment พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณโคลนที่ให้ผลบวกสูงกว่าวิธีดั้งเดิมถึง 116 เท่า ข้อจำกัดของการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์วิธีนี้ คือ มีความยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่หลังจากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ได้แล้ว สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อยและชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ไม่ต้องมีคุณภาพมากนัก นอกจากนี้ ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ที่ห้องปฏิบัติการใดก็ได้ มีภาวะพหุสัณฐานสูง และยังมีการข่มแบบ codominance จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ อย่างมากมาย (สุรินทร์, 2552)

14. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในพืช

เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง จึงมีการใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น

1. การจำแนกพันธุ์พืช ตรวจสอบความบริสุทธิ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรม

ในประเทศไทยมีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในมะเขือเทศจำนวน 8 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ สามารถบอกความแตกต่างในระดับจีโนมไทป์ระหว่างพ่อ และแม่ได้ดี (ณัญยา, 2545) และใช้จำแนกพันธุ์ข้าวที่มีความหอม (ข้าวดอกมะลิ 105, กข 15 และ กข 6) ออกจากข้าวที่ไม่มีความหอม (ชัยนาท 1) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในตำแหน่ง RM 17 ในจีโนมของข้าว พบว่าข้าวที่มีกลิ่นหอม จะมีจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์ CT ของเครื่องหมาย RM 17 มากกว่าข้าวที่ไม่มีความหอม โดยข้าวพันธุ์ชัยนาทมีจำนวน 6 ซ้ำ ในขณะที่ข้าวขาวดอกมะลิ 105, กข 15 และ กข 6 มีจำนวน 14, 12 และ 13 ซ้ำ ตามลำดับ (ปรีชา และปีย์วรา, 2548) นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ในการตรวจสอบการปลอมปนในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (นฤมล และคณะ, 2547) และในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานในพืชต่าง ๆ มากมาย เช่น ข้าวสาลี (Gupta and Varshney, 1998), ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) (Gimenes *et al.*, 1998), lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) (Hicks *et al.*, 1998), *Pinus pinaster* Ait. (Mariettea *et al.*, 1998), brazilian endangered tree (*Caryocar brasiliense*) (Collevatti *et al.*, 1999), *Populus tremuloides* (Rahman *et al.*, 1999), ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) (Paniego *et al.*, 2001), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) (Ashkenazi *et al.*, 2001), ถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*) (Gaitán *et al.*, 2002), peach (*Prunus persica* L.) (Dirle *et al.*, 2002), ถั่วเหลือง (*Glycine max*) (Hossain *et al.*, 2002), melon (*Cucumis melo* L.) (Chiba *et al.*, 2002; Ritschel *et al.*, 2004), avocado (*Persea americana* Mill.) (Ashworth *et al.*, 2003), *Cannabis sativa* (Alghanim and Almirall, 2003), almond (*Prunus dulcis*) (Yong *et al.*, 2004), สตรอเบอรี่ (*Fragaria vesca*) (Hadonou *et al.*, 2004), sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) (Tani *et al.*, 2004), แอปเปิ้ล (*Malus pumila* Mill.) (Wunsch, 2006), ส้ม (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Novelli *et al.*, 2006), *Catharanthus roseus* L.) (Shokeen *et al.*, 2006) และ common elder (*Sambucus nigra*) (Clarke and Tobutt, 2006) เป็นต้น

2. ใช้ในการทำแผนที่ยีน หรือ จีโนม และติดตามยีนที่สนใจ

การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูง จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนในพืชหลายชนิด เช่น นำไปใช้ทำแผนที่พันธุกรรม (genetic map) ในถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*) (Gaitán-Solís *et al.*, 2002) ข้าวสาลี (Gupta *et al.*, 2002) และแตง (Ritschel *et al.*, 2004) รวมทั้งใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการติดตามยีนต่าง ๆ เช่น ในข้าวสาลีติดตามยีนต้านทานต่าง ๆ ได้แก่ ยีนต้านทาน stripe rust หรือ yellow rust (Fahima *et al.*, 1998; Chagué *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002) ยีนต้านทานโรค leaf rust (Suenaga *et al.*, 2001; Schnurbusch *et al.*, 2004; Vikal *et al.*, 2004; McCartney *et al.*, 2005; Obert *et al.*, 2005) ยีนต้านทานโรค *Fusarium* head blight (Wei *et al.*, 2005) และยีนต้านทานเชื้อรา powdery mildew (Chen *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005) นอกจากนี้ ยังมี ยีนต้านทานแมลง Russian wheat aphid (RWA) (Miller *et al.*, 2001) ยีนที่ทำให้แคระแกร็น (dwarfing gene) (Korzun *et al.*, 1997; 1998) และยีน thermo-sensitive genic male-sterile (Xing *et al.*, 2003) สำหรับในถั่วเหลืองมียีนต้านทานโรค frogeye leaf spot (FLS) (Yang *et al.*, 2001) และการศึกษาติดตามยีนในข้าว เช่น ยีนต้านทานโรค sheath blight (Che *et al.*, 2003) ยีนต้านทานโรค bacterial leaf blight (BB) (Rao *et al.*, 2003) ยีน fertility-restoring (Rf) ในระบบ CMS (Cytoplasmic male sterility) (Tan *et al.*, 2004) ยีนต้านทานแมลง whitebacked planthopper (WBPH) (Kadirvel *et al.*, 2003) และยีน premature senescence (Pse(t)) (Li *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการติดตามยีนควบคุมสีของเมล็ดใน *Brassica juncea* (Padmaja *et al.*, 2005) เพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันในเมล็ดให้ดีขึ้น ยีนต้านทานโรค leaf scald ในข้าวบาร์เลย์ (Genger *et al.*, 2003) และยีนทนต่อดินที่มีอลูมิเนียมสูงในข้าวบาร์เลย์ (Raman *et al.*, 2003) ในข้าวไรย์ (Matos *et al.*, 2005) เป็นต้น

สำหรับในประเทศไทย มีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ช่วยในการคัดเลือกพริกที่มีลักษณะต้านทานต่อโรค โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สามารถใช้คัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (อรรคณ, 2543)

15. เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ (ISSR marker)

เป็นเครื่องหมายชนิด PCR- based marker เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถแยกสิ่งมีชีวิตในระดับชนิดจนถึงภายในชนิดได้ พัฒนาขึ้นโดย Zietkiewicz ในปี 1994 โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำ หรือ ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์เพียงชนิดเดียว ไพรเมอร์ที่ใช้ อาจเป็น di-, tri-, tetra- หรือ pentanucleotide ได้ เช่น (AG)₆ (TC)₈ หรือ (ACG)₄ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างลำดับเบสชุดซ้ำ เพื่อตรวจสอบความถี่ของลำดับเบสชุดซ้ำนั้นในจีโนมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์กระจายอยู่ทั่วจีโนม จึงสามารถตรวจสอบจีโนมได้กว้างขวาง แต่ไพรเมอร์ที่ใช้ อาจไม่เฉพาะในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ทำให้มีความยาวของชิ้นดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้ง จึงมีการเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 5' หรือ ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (5' or 3' anchored primer) เพื่อให้มีความจำเพาะกับลำดับเบสที่ทราบข้างดีเอ็นเอชุดซ้ำได้ (Zietkiewicz *et al.*, 1994) ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สามารถตรวจสอบได้โดยไม่ต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน และตรวจสอบพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ในด้านค่าใช้จ่ายเทคนิคนี้มีค่าใช้จ่ายในการศึกษาที่ไม่สูงนัก และไม่ยุ่งยากซับซ้อน

16. การสังเคราะห์กรดไขมัน และยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมัน

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันของพืชเป็นวิถีเมแทบอลิซึมปฐมภูมิ (primary metabolic pathway) ที่เกิดขึ้นในพลาสติดของเซลล์พืชทุกเซลล์ (Ohlrogge and Browse, 1995; Ohlrogge *et al.*, 1979; Schmid and Ohlrogge, 1996) ประกอบด้วย 2 กระบวนการ ดังนี้

1. prokaryotic pathway เกิดขึ้นภายในผนังด้านในของคลอโรพลาสต์ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 16:0-ACP (acyl carrier protein) และ 18:1-ACP

2. eukaryotic pathway เกิดขึ้นที่ ER (endoplasmic reticulum) โดยมีการนำกรดไขมันออกจากคลอโรพลาสต์ ไปสร้างเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวอื่น ๆ และรวมกับ acyl glycerol-3-phosphate เพื่อสร้างเป็นไขมันที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ของพืช เช่น ผนังเซลล์ หรือ เป็นไขมันสะสมไว้ที่เมล็ด เป็นต้น ไขมันที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์จะอยู่ในรูป DAG (diacylglycerol) เป็น lipid bilayer ทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์ ป้องกันอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม

ภายนอกเซลล์ และยังมีบทบาทใน signal transduction pathway ส่วนไขมันที่เก็บสะสมในเมล็ดนั้น จะอยู่ในรูปของ TAG (triacylglycerol) สะสมในรูปแบบของ oil body มีส่วนของโปรตีนที่เป็น พณังชั้นเดียวห่อหุ้ม เรียกว่า oleosin ทำหน้าที่เป็นไขมันสะสม เก็บไว้ให้พลังงานในการงอก ของเมล็ด และการถ่ายละอองเกสร

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันเกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ โดยเริ่มต้นจาก acetyl-CoA ถูกนำเข้ามาในคลอโรพลาสต์ การสังเคราะห์กรดไขมันที่ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 การสร้าง malonyl-CoA จาก acetyl-CoA ในพลาสติด โดยปฏิกิริยา carboxylation ที่เร่งโดยเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (ACCase)

ขั้นที่ 2 การเปลี่ยน malonyl-CoA เป็น malonyl-ACP โดยเอนไซม์ malonyl CoA: ACP tran acylase

ขั้นที่ 3 condensation เป็นปฏิกิริยาการรวม acetyl-CoA และ malonyl-ACP ได้เป็น acetoacetyl-ACP (3-ketobutyryl-ACP) โดยเอนไซม์ KASIII (ketoacyl-ACP synthaseIII) ปฏิกิริยา นี้เป็นการรวมสาร C-2 และสาร C-3 ได้สาร acetoacetyl-ACP (C-4) และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ ออก (CO₂) 1 โมเลกุล

ขั้นที่ 4 reduction เป็นปฏิกิริยาที่มีการ reduced กลุ่ม keto (-C=O) ในตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ของ 3-ketobutyryl-ACP ให้เป็นกลุ่มของ hydroxyl (-OH) ได้เป็น 3-hydroxybutyryl-ACP ด้วย เอนไซม์ ketoacyl-ACP reductase โดยใช้ NADPH เป็น coenzyme

ขั้นที่ 5 dehydration เป็นปฏิกิริยาที่มีการดึงหมู่ -OH ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ของ 3-hydroxybutyryl-ACP ออก ทำให้เกิดพันธะคู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 2 ได้เป็น trans- Δ^2 -butenoyl-ACP ด้วยเอนไซม์ 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase

ขั้นที่ 6 reduction เป็นปฏิกิริยาที่มีการ reduced พันธะคู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 2 ให้เป็น พันธะเดี่ยวด้วยเอนไซม์ enoyl-ACP reductase โดยใช้ NADPH เป็น coenzyme ได้เป็น butyryl-ACP ซึ่ง เป็นรอบแรกในการสังเคราะห์กรดไขมัน

ในรอบที่สองของการสังเคราะห์กรดไขมัน butyryl-ACP จะถูกเติมคาร์บอนเพิ่มอีก 2 อะตอม ในปฏิกิริยา condensation โดยนำคาร์บอนมาจาก malonyl-ACP การต่อสายยาวของคาร์บอนในรอบต่อ ๆ ไปโดยปฏิกิริยา condensation ด้วยเอนไซม์ KAS (ketoacyl-ACP synthase) จะใช้เอนไซม์ต่างชนิดจากรอบแรก เนื่องจาก KAS มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีความยาวของสายคาร์บอนต่างกัน ดังนี้ KASIII จำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีความยาวคาร์บอน 2 อะตอม KASI จำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีความยาวของสายคาร์บอน 4-14 อะตอม และ KASII จำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีความยาวคาร์บอน 16 อะตอม

ในคลอโรพลาสต์ยังมีกระบวนการสร้างพันธะคู่ (desaturation) เพื่อสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวที่มี 18 คาร์บอน (18:1-ACP) เช่น oleic acid ซึ่งจะเริ่มปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ stearoyl-acyl carrier protein (ACP) desaturase (SAD) และสิ้นสุดปฏิกิริยาการเพิ่มความยาวของกรดไขมันในพลาสติด โดยเอนไซม์ acyl-ACP-thioesterase (Fat) ซึ่งจะทำหน้าที่ hydrolyze หมู่ acyl chain จาก ACP หลังจากนั้นกรดไขมันอิสระก็จะไปจับกับ CoA ในรูปของ ester แล้วขนส่งออกจากพลาสติด ส่งต่อไปยัง ER (endoplasmic reticulum) โดยกรดไขมันเหล่านี้จะรวมตัวกับ glycerol-3-phosphate ได้เป็น phosphatidic acid เพื่อสร้างเป็น phospholipid DAG และ TAG ต่อไป นอกจากนี้กระบวนการดัดแปลงกรดไขมัน เช่น desaturation, hydroxylation และ elongation ยังเกิดขึ้นที่ ER ขณะที่กรดไขมันยังต่ออยู่กับ glycerolipids หรือ CoA ในระยะที่เมสส์กำลังพัฒนา จะมีการสลาย acyl chains ใน ER ไปรวมกับ glycerol ทำให้ได้ TAG สะสมในเมสส์

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (amino acid) และความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสามารถจำแนกเอนไซม์ Fat ในพืชได้เป็น 2 ชนิด คือ FatA และ FatB ซึ่งมีวิวัฒนาการแยกออกจากกัน FatA ที่รู้จักกันดี ได้แก่ oleoyl-ACP thioesterase ซึ่งมีความจำเพาะกับ oleoyl-ACP (C18:1-ACP) และเนื่องจากกรดไขมันที่พบมากในพืชคือ oleic acid เอนไซม์ FatA จึงจัดอยู่ในกลุ่ม house keeping enzyme สำหรับ FatB จะค่อนข้างจำเพาะกับ saturated acyl-ACP ที่มีจำนวนคาร์บอนของหมู่ acyl ตั้งแต่ C₁₀-C₁₆ (Hawkings and Kridl, 1998; Kridl *et al.*, 1992) พบว่าปลายทางด้าน N-terminal ของเอนไซม์ FatA และ FatB เป็นตัวตัดสินความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (Salas and Ohlrogge, 2002)

เอนไซม์ ER linoleate desaturase หรือ FAD3 เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ ω -3 fatty acid desaturase มีตำแหน่งอยู่ที่เมมเบรน (membrane bound enzyme) เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมี 2 isoform คือ isoform ที่อยู่บนเมมเบรนของไมโทคอนเดรีย (FAD3) และ isoform ที่อยู่บน

เมมเบรนของพลาสติก (FAD7/FAD8) โปรตีน FAD3 มีตำแหน่งอยู่ที่ ER ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน linoleic acid (18:2) เป็น linolenic acid (18:3) ที่ตำแหน่ง ω -3 ส่วน ER linoleate desaturase (FAD6) พบในคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน oleic acid (18:1) เป็น linoleic acid (18:2) ที่ตำแหน่ง ω -6 (Mazliak, 1994)

17. Allele Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR)

AS-PCR หรือ PCR amplification of specific allele (PASA) เป็น DNA marker ประเภท PCR-based marker ที่อาศัยเทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่สนใจ ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้จะต้องมีข้อมูลลำดับเบสของยีน และตำแหน่งของ exon และ intron เพื่อออกแบบไพรเมอร์จำเพาะให้ครอบคลุมส่วนที่เป็น intron ของยีน สามารถตรวจสอบความแตกต่างของขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส เรียกเทคนิคนี้ว่า DFLP (DNA Fragment Length Polymorphism) หรือ ตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แตกต่างกันใน non-denaturing polyacrylamide gel เรียกว่า เทคนิค SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) (Slabaugh *et al.*, 1997; Hongtrakul *et al.*, 1998) ในบางกรณีอาจนำผลผลิตพีซีอาร์ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนนำมาตรวจสอบโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อเพิ่มโอกาสของความแตกต่าง อันเนื่องมาจากผลผลิตพีซีอาร์มีตำแหน่งจุดตัดที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธีการนี้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตหอไมโซโกต และเฮเทอโรไมโซโกตได้ และสามารถตรวจสอบการกลายที่เกิดจาก deletion, insertion และ point mutation ที่ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ต่างกันได้

18. Single Strand Conformational polymorphisms (SSCP)

SSCP เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างระดับนิวคลีโอไทด์ โดยอาศัยสมบัติการสร้างโครงรูปทุติยภูมิที่แตกต่างกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวภายใต้สภาพ non-denaturation และความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แม้เพียง 1 นิวคลีโอไทด์ ที่มีผลทำให้มีโครงสร้างทุติยภูมิแตกต่างกัน เป็นผลให้การเคลื่อนที่ใน non-denaturing polyacrylamide gel ต่างกัน การตรวจสอบผลทำโดยย้อมดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งเทคนิค SSCP อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ก่อน ในกรณีที่ดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่มาก ควรนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้มีขนาดเล็กลง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP เรียกเทคนิคนี้ว่า Ref-SSCP (Restriction endonuclease fingerprinting-SSCP) (Slabaugh *et al.*, 1997) เทคนิค SSCP ได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้

ตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของดีเอ็นเอมนุษย์เป็นครั้งแรกโดย Orita *et al.* (1989)

โดยย่อยจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำให้เสียสภาพเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

ด้วยสารละลายต่าง แล้วนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน neutral polyacrylamide gel ผลการตรวจสอบ

พบความหลากหลายของแอลลีล เป็นไปตามกฎของเมลเคล เช่นเดียวกับ RFLP marker



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างสปีดที่ใช้ในการศึกษา

รวบรวมสปีดจากทั้งในประเทศ ต่างประเทศ และพืชชนิดอื่นในวงศ์ Euphorbiaceae รวมจำนวน 127 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รายชื่อสปีดที่รวบรวมจากในประเทศ ต่างประเทศ และพืชชนิดอื่นในวงศ์ Euphorbiaceae

หมายเลข	ชื่อ	แหล่งที่รวบรวมตัวอย่าง	หมายเหตุ
1	สปีดแอนนา 16	บ้านโนนปอแดง อ. ขางตลาด จ. กาฬสินธุ์ (เมล็ดคก)	กิ่งชำ
2	สปีดแอนนา 20/1	บ้านโนนก่อ อ. นิคมคำสร้อย จ. มุกดาหาร (เมล็ดคก)	กิ่งชำ
3	สปีดแอนนา 33/1	บ้านดาง อ. สังขละ จ. สุรินทร์	กิ่งชำ
4	สปีดแอนนา 34/8	บ้านไก่อ้อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ	กิ่งชำ
5	สปีดแอนนา 78/9	หมู่ 1 อ. ชะอวด จ. นครศรีธรรมราช	กิ่งชำ
6	สปีดแอนนา 80/3	หมู่ 6 บ้านประคู้ อ. เมือง จ. พัทลุง	กิ่งชำ
7	สปีดแอนนา 27/4	บ้านหนองคูณ อ. เขมราฐ จ. อุบลราชธานี	กิ่งชำ
8	สปีด นครราชสีมา 1	อ. โนนสูง จ. นครราชสีมา (เขตดินเค็ม)	กิ่งชำ
9	สปีดแอนนา 18/3	บ้านหนองม่วง อ. โพนทอง จ. ร้อยเอ็ด	กิ่งชำ
10	สปีดแอนนา 83/5	เขตเทศบาล อ. เมือง จ. บึงกาฬ	กิ่งชำ
11	สปีดแอนนา 69/1	หมู่ 3 อ. เมือง จ. เพชรบุรี	กิ่งชำ
12	สปีดแอนนา 6/8	บ้านใหม่สำโรง 1 อ. สีแก้ว จ. นครราชสีมา	กิ่งชำ
13	สปีด FF25B-14	งานเกษตรแฟร์ 2549	ติดตา
14	สปีด FF20-Sbr-3	งานเกษตรแฟร์ 2549	ติดตา
15	สปีด E-L-23	งานเกษตรแฟร์ 2549	ติดตา
16	สปีด จันทบุรี	อ. สอยดาว จ. จันทบุรี (ยอดอ่อน ก้าน สีเขียวไม่แดง)	เมล็ด
17	สปีด ค่านช้างสุพรรณบุรี	หมู่บ้านกะเหรี่ยง อ. ค่านช้าง จ. สุพรรณบุรี (ลูกคก)	กิ่งชำ

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อ	แหล่งที่รวบรวมตัวอย่าง	หมายเหตุ
18	สบู่ดำ 108-21-50	จ. แพร่	กึ่งชำ
19	สบู่ดำ 101-32-115	จ. ลำปาง	กึ่งชำ
20	สบู่ดำ นครราชสีมา 2	ต. หหนองสรวง อ. ขามทะเลสอ จ. นครราชสีมา	กึ่งชำ
21	สบู่ดำ อินเดีย-สตูล	ลูกผสม เมีย อินเดีย × ผู้ สตูล	ทาบกิ่ง
22	สบู่ดำ F US7/1-M 6	ลูกผสม เมีย US แอนนา (7) × ผู้ อินเดีย (6)	เมล็ด
23	สบู่ดำ F 26/21-E-L-23	ลูกผสม เมีย แอนนา 21 (26) × ผู้ E-L-23 (54)	เมล็ด
24	สบู่ดำ JD	จ. นครราชสีมา	กึ่งชำ
25	สบู่ดำ มุกดาหาร 10 Krad	จ. มุกดาหาร ฉายรังสี 10 Krad (อายุ 3 เดือน ออกดอก)	กึ่งชำ
26	สบู่ดำ สุขสันต์ 10 Krad	ฉายรังสีเมล็ดพันธุ์ สุขสันต์ 10 Krad	เมล็ด
27	สบู่ดำ 300 Krad 1	ฉายรังสีเมล็ดพันธุ์ อ. สายัณห์ 300 Krad	กึ่งชำ
28	สบู่ดำ 300 Krad 2	ฉายรังสีเมล็ดพันธุ์ อ. สายัณห์ 300 Krad	กึ่งชำ
29	สบู่ดำ 300 Krad 3	ฉายรังสีเมล็ดพันธุ์ อ. สายัณห์ 300 Krad	กึ่งชำ
30	สบู่ดำ สหรัฐ 8.45 Krad	อ. สุขสันต์ (ผลผลิตสูง) (Chronic Irradiation)	กึ่งชำ
31	สบู่ดำ สหรัฐอเมริกา	ประเทศสหรัฐอเมริกา	กึ่งชำ
32	สบู่ดำ ฮาวาย	รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา	กึ่งชำ
33	สบู่ดำ สุรินัม (Suriname)	พิชัย มณี โชติ (Northeast coast of South America)	เมล็ด
34	สบู่ดำ อินเดีย 1	ประเทศอินเดีย	เมล็ด
35	สบู่ดำ อินเดีย 2	งานเกษตรแฟร์ 2549	ติดตา
36	สบู่ดำ อินเดีย 3	แคว้น Chennai ภาคใต้ รัฐทมิฬนาฑู ประเทศอินเดีย	เมล็ด
37	สบู่ดำ อินเดีย 4	อ. สุขสันต์	กึ่งชำ
38	สบู่ดำ อินเดีย 5	แคว้นราชาน ประเทศอินเดีย	เมล็ด
39	สบู่ดำ อินเดีย 6 (D1)	ปลูกส่งเสริมที่อินเดีย	กึ่งชำ
40	สบู่ดำ อินเดีย 7	โครงการปลูกป่าชายพัฒนา อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์	เมล็ด
41	สบู่ดำ ลาว	ประเทศลาว	เมล็ด
42	สบู่ดำ ศรีลังกา 1	อ. สุขสันต์ /นรินทร์ สมบูรณ์สาร	กึ่งชำ
43	สบู่ดำ ศรีลังกา 2	งานเกษตรแฟร์ 2549	ติดตา
44	สบู่ดำ จีน	ม.เทคโนโลยีราชมงคล จ. สุรินทร์ อ. กิตตินำมาจากจีน	เมล็ด
45	สบู่ดำ จีน (แอนนา)	อ. แอนนา	กึ่งชำ
46	สบู่ดำ เขมร	อ. สุขสันต์	กึ่งชำ
47	สบู่ดำ พม่า 1	Central Agricultural Research Institute, Yezin, Myanmar	เมล็ด

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อ	แหล่งที่รวบรวมตัวอย่าง	หมายเหตุ
48	สบู่ดำ พม่า 2	Central Agricultural Research Institute, Yezin, Myanmar	เมล็ด
49	สบู่ดำ อินโดนีเซีย	ประเทศอินโดนีเซีย	เมล็ด
50	สบู่ดำ พืช-พิเศษ	อ. สุขสันต์ (SA)	เมล็ด
51	สบู่ดำ สุขสันต์ 1	อ. สุขสันต์ (Maxico)	กิ่งชำ
52	สบู่ดำ สุขสันต์ 2	อ. สุขสันต์ (Maxico) #6 Phorbol ester = 0.01% (>0.011% มีพิษ)	กิ่งชำ
53	สบู่ดำ สุขสันต์ 3	อ. สุขสันต์ (Maxico) #5 Phorbol ester = 0.01%	กิ่งชำ
54	สบู่ดำ สุขสันต์ 4	อ. สุขสันต์ (Maxico) #9 หัวหิน ไกลกังวล	กิ่งชำ
55	สบู่ดำ สุขสันต์ 5	ประเทศเปรู พันธุ์ปรับปรุงแล้ว	เมล็ด
56	สบู่ดำ สุขสันต์ 6	ประเทศเปรู พันธุ์พื้นเมือง	เมล็ด
57	สบู่ดำ พืชโลก	จ. พืชโลก (ต้นเดี่ยว แตกกิ่งก้านดี)	เมล็ด
58	สบู่ดำ สตูล	จ. สตูล	เมล็ด
59	สบู่ดำ ขอนแก่น	จ. ขอนแก่น	กิ่งชำ
60	สบู่ดำ ปทุมธานี	จ. ปทุมธานี	กิ่งชำ
61	สบู่ดำ มุกดาหาร	อ. เมือง จ. มุกดาหาร	กิ่งชำ
62	สบู่ดำ ระยอง	อ. มาบตาพุด จ. ระยอง	เมล็ด
63	สบู่ดำ ม.ก.	คณะประมง มก. (บางเขน)	กิ่งชำ
64	สบู่ดำ ชัยนาท	อ. เนินขาม จ. ชัยนาท	กิ่งชำ
65	สบู่ดำ พะเยา	อ. เชียงม่วน จ. พะเยา	เมล็ด
66	สบู่ดำ นครราชสีมา 3	มก. (กำแพงแสน)	เมล็ด
67	สบู่ดำ นครราชสีมา 4	จ. นครราชสีมา	กิ่งชำ
68	สบู่ดำ ประจวบฯ	อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์	กิ่งชำ
69	สบู่ดำ ใบบ้าง	จ. กรุงเทพฯ	กิ่งชำ
70	สบู่ดำ แอนนา 21/7	บ้านโพธิ์ไทร อ. คอนตาล จ. มุกดาหาร	กิ่งชำ
71	สบู่ดำ 4 เมล็ด	จ. กรุงเทพฯ	กิ่งชำ
72	สบู่ดำ เชียงใหม่	อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่	เมล็ด
73	สบู่ดำ นครปฐม	สามกระบือเผือก จ. นครปฐม	เมล็ด
74	สบู่ดำ อินเดีย 8	ประเทศอินเดีย	เมล็ด
75	สบู่ดำ อินเดีย 9	ร้านพันธุ์ไม้เกษตร มก. จ. กรุงเทพฯ	เมล็ด

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อ	แหล่งที่รวบรวมตัวอย่าง	หมายเหตุ
76	สบู่ดำ อุทัยธานี	อ. บ้านไร่ จ. อุทัยธานี	กิ่งชำ
77	สบู่ดำ ปราจีนบุรี	อ. กบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	กิ่งชำ
78	สบู่ดำ หนองคาย	บ. น้ำมันสบู่ดำไทย จำกัด จ. หนองคาย	เมล็ด
79	สบู่ดำ ลำปาง	ม. เทคโนโลยีราชชมงคลล้านนา จ. ลำปาง (จิตตา)	เมล็ด
80	สบู่ดำ กาญจนบุรี	อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี	กิ่งชำ
81	สบู่ดำ เพชรบูรณ์	อ. ชนแดน จ. เพชรบูรณ์	กิ่งชำ
82	สบู่ดำ แอนนา 14/5	บ้านหนองลมพุก อ. ขางตลาด จ. กาฬสินธุ์	กิ่งชำ
83	สบู่ดำ แอนนา 24/2	บ้านโคกขาว อ. ทราชมูล จ. ยโสธร	กิ่งชำ
84	สบู่ดำ แอนนา 31/2	บ้านโคกสะอาด อ. ละหารทราย จ. บุรีรัมย์	กิ่งชำ
85	สบู่ดำ แอนนา 36/2	บ้านผักกะ อ. ขางหม่น้อย จ. ศรีสะเกษ	กิ่งชำ
86	สบู่ดำ แอนนา 49	ตำบลบ่อทอง อ. ทองแสนขัน จ. อุตรดิตถ์	กิ่งชำ
87	สบู่ดำ แอนนา 52	บ้านปางมอญ ต. อำเภอไผ่ จ. เวียงสา จ. น่าน	กิ่งชำ
88	สบู่ดำ แอนนา 67	บ้านตาก ต. ตากออก อ. บ้านตาก จ. ตาก	กิ่งชำ
89	สบู่ดำ แอนนา 74/1	ม. 2 บ้านบางน้ำจืด อ. หลังสวน จ. ชุมพร	กิ่งชำ
90	สบู่ดำ แอนนา 75/8	ม. 2 ต. แยกบ้านนาเดิม อ. บ้านนาเดิม จ. สุราษฎร์ธานี	กิ่งชำ
91	สบู่ดำ แอนนา 86/2	ม. 21 อ. วังวิเศษ จ. ตรัง	กิ่งชำ
92	สบู่ดำ แอนนา 87/1	ม. 2 อ. คลองท่อม จ. กระบี่	กิ่งชำ
93	สบู่ดำ นครสวรรค์	จ. นครสวรรค์	กิ่งชำ
94	สบู่ดำ ทองสุพรรณ	ต. หนองไผ่พันมือ อ. ศรีประจัน จ. สุพรรณบุรี	เมล็ด
95	สบู่ดำ 19-19-109	จ. แพร่ 3	กิ่งชำ
96	สบู่ดำ 72-19-8	จ. แพร่ 3	กิ่งชำ
97	สบู่ดำ 1-32-8	จ. ลำปาง	กิ่งชำ
98	สบู่ดำ 84-10-53	จ. แพร่	กิ่งชำ
99	สบู่ดำ 34-14-30	จ. แพร่ 1	กิ่งชำ
100	สบู่ดำ 107-10-57	จ. แพร่	กิ่งชำ
101	สบู่ดำ 95-32-107	จ. ลำปาง	กิ่งชำ
102	สบู่ดำ 4-18-36	จ. แพร่ 2	กิ่งชำ
103	สบู่ดำ หัวหิน	โครงการปลูกป่าชายพัฒนา อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์	เมล็ด
104	สบู่ดำ นครราชสีมา 5	ศูนย์วิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร อ. สีแก้ว จ. นครราชสีมา	เมล็ด

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อ	แหล่งที่รวบรวมตัวอย่าง	หมายเหตุ
105	สบู่ดำ พม่า 3	Central Agricultural Research Institute, Yezin, Myanmar	เมล็ด
106	สบู่ดำ พม่า 4	Central Agricultural Research Institute, Yezin, Myanmar	เมล็ด
107	สบู่ดำ พม่า 5	Central Agricultural Research Institute, Yezin, Myanmar	เมล็ด
108	สบู่ดำ พม่า 6	Central Agricultural Research Institute, Yezin, Myanmar	เมล็ด
109	สบู่ดำ F US 7/2-M 6	ลูกผสม เมีย US แอนนา (7) × ผู้ อินเดีย (6)	เมล็ด
110	สบู่ดำ F 26/22-M 54	ลูกผสม เมีย แอนนา 21 (26) × ผู้ E-L-23 (54)	เมล็ด
111	สบู่ดำ JA	จ. นครราชสีมา	กิ่งชำ
112	สบู่ดำ JB	จ. นครราชสีมา	กิ่งชำ
113	สบู่ดำ JC	จ. นครราชสีมา	กิ่งชำ
114	สบู่ดำ JE	จ. นครราชสีมา	กิ่งชำ
115	สบู่แดง	<i>Jatropha gossypifolia</i> L. จ. กรุงเทพฯ	เมล็ด
116	มะเขือหิน	<i>Aleurites</i> sp., Family Euphorbiaceae จ. กรุงเทพฯ	เมล็ด
117	สบู่ดำ วิชาญ-พิชัย 1	พิชัย ไม่มีพิษ จ. นครปฐม	เมล็ด
118	สบู่ดำ สุขสันต์-พิชัย 1	พิชัย ไม่มีพิษ จ. นครปฐม	เมล็ด
119	สบู่ดำ สุขสันต์อุทอง 1	จ. สุพรรณบุรี	เมล็ด
120	สบู่ดำ สุขสันต์อุทอง 3	จ. สุพรรณบุรี (K3)	กิ่งชำ
121	สบู่ดำ ผลรี	กำแพงแสน จ. นครปฐม (โรงเรียนสบู่ดำ)	กิ่งชำ
122	สบู่ดำ วิชาญ-พิชัย 2	พิชัย ไม่มีพิษ จ. นครปฐม	เมล็ด
123	สบู่ดำ สุขสันต์-พิชัย 2	พิชัย ไม่มีพิษ จ. นครปฐม	เมล็ด
124	สบู่ดำ สุขสันต์อุทอง 2	จ. สุพรรณบุรี	กิ่งชำ
125	สบู่ดำ สุขสันต์อุทอง 4	จ. สุพรรณบุรี (L4)	กิ่งชำ
126	สบู่ดำ สุขสันต์อุทอง 5	จ. สุพรรณบุรี (M5)	กิ่งชำ
127	สบู่ดำ สุขสันต์อุทอง 6	จ. สุพรรณบุรี (K26)	กิ่งชำ

2. สารเคมี และเอนไซม์

2.1 สารเคมี และเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.1 ไนโตรเจนเหลว

2.1.2 3X CTAB buffer (3 % CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1 % polyvinylpyrrolidone: PVP)

2.1.3 beta-mercaptoethanol

2.1.4 10 % CTAB ใน 0.7 M NaCl

2.1.5 คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) โดยปริมาตร

2.1.6 เอทานอล 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอลสัมบูรณ์

2.1.7 10 mg/ml RNase A บริษัท US Biological, USA

2.1.8 TE buffer (10:0.1 = 10 mM Tris pH 8.0: 0.1 mM EDTA)

2.2 สารเคมี และเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

2.2.1 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 500 mM KCl)

2.2.2 50 mM MgCl₂

2.2.3 2 mM dNTP บริษัท Fermentas, USA

2.2.4 เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase บริษัท Invitrogen Life Technology, Brazil

2.2.5 5 pmol primer

2.3 สารเคมีสำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส

2.3.1 เจลอะกาโรส (Research Organic)

2.3.2 Loading dye (0.15 % bromphenol blue ใน 50 % glycerol)

2.3.3 1X TBE buffer (Tris base 10.8 กรัม, Boric acid 5.5 กรัม และ 500 mM EDTA pH 8.0 4 มิลลิลิตร)

2.3.4 0.5 mg/ml เอธิเดียมโบรไมด์ (Bio Basic)

2.3.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder mix) บริษัท GeneRuler™, USA

2.4 สารเคมีสำหรับ denaturing และ non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

2.4.1 bind silane (Plusone)

2.4.2 repel silane (Plusone)

2.4.3 glacial acetic acid (Merck)

2.4.4 95 % เอทานอล

2.4.5 acrylamide และ methylene bisacrylamide บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

2.4.6 TBE buffer

2.4.7 urea (USB)

2.4.8 10 % ammonium persulphate (APS)

2.4.9 TEMED (N, N, N', N',-tetramethyl ethylenediamine)

2.4.10 ซิลเวอร์ไนเตรท (Merck)

2.5 สารเคมีที่ใช้สำหรับ microsatellite enrichment และ dot blot hybridization

2.5.1 hybridization buffer (6X SSC, 0.1 % SDS)

2.5.2 binding and washing buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl)

2.5.3 20X SSC (standard saline citrate buffer) (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate) บริษัท Vivantis, Republic of Poland

2.5.4 20 % SDS (sodium dodecyl sulfate)

2.5.5 biotinylated oligo probe KU-VECTOR Custom DNA Laboratory มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5.6 magnetic beads (Dynal) บริษัท Invitrogen, Norway

2.5.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* บริษัท Fermentas, USA

2.5.8 เอนไซม์ T4 DNA Ligase บริษัท Fermentas, USA

2.5.9 *MseI* adaptor และ M1 primer (*MseI*+C primer)

2.5.10 ชุดตรวจสอบ North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit บริษัท Pierce Biotechnology, USA

2.5.11 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit บริษัท RBC Bioscience, Taiwan

2.6 สารเคมีที่ใช้ในการโคลน

- 2.6.1 อาหาร Luria-Bertani medium (LB) และ Luria-Bertani agar medium (LB agar)
- 2.6.2 polyethylene glycol (PEG) 8000
- 2.6.3 dimethyl sulfoxide (DMSO) และ $MgCl_2$
- 2.6.4 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactoside (X-gal)
- 2.6.5 isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG)
- 2.6.6 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (5 mg/100 ml)
- 2.6.7 pGEM[®]-T Vector บริษัท Promega, USA
- 2.6.8 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป High-Speed Plasmid Mini Kit บริษัท Geneaid, Taiwan

3. โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางชีวโมเลกุลบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

- 3.1 โปรแกรม BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ หรือ โปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูล
- 3.2 โปรแกรม ClustalW 1.82 จาก <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ โปรตีนที่กำลังศึกษา
- 3.3 โปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System-pc เวอร์ชัน 2.20k) ใช้ในการสร้าง dendrogram จากข้อมูลการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ และ ISSR
- 3.4 โปรแกรม FastPCR ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

วิธีการ

1. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากสบู่น้ำ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนสบู่น้ำ โดยใช้วิธีที่ประยุกต์จาก Doyle and Doyle (1990) มีวิธีการดังนี้

นำใบอ่อนสบู่น้ำน้ำหนักประมาณ 2 กรัม มาบดในไนโตรเจนเหลว ให้เป็นผงละเอียด ตักตัวอย่างใส่ในสารละลายของ 3X CTAB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลาย beta-mercaptoethanol 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว และเติมคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ดูดสารละลายใสส่วนบน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร (ได้ประมาณ 6 หลอด) และเติม 10 % CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน 300 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร โดยรวมสารละลายให้ได้ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใน 1 หลอด จากนั้นเติมเอทานอลสัมบูรณ์ที่แช่เย็นจัด ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถ้าดีเอ็นเอมีปริมาณมากใช้หลอดดูดปลายแหลมหัวงอเกี่ยวดีเอ็นเอ (DNA hook) ใส่หลอดใหม่ ถ้าดีเอ็นเอมีปริมาณน้อย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนสารละลายใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70 % เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนอีกครั้งด้วย 90 % เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้งอีกครั้ง คว่ำหลอดบนกระดาษ ซับให้แห้ง หรือ ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอนใน TE buffer 100 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตะกอนละลายเร็วขึ้น จากนั้นเติมเอนไซม์ RNase (1µg/ml) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer ถ้าอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6-1.8 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ หากมีค่าต่ำกว่า 1.6 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน แต่ถ้าค่าสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ การดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของกรดนิวคลีอิกจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นสูงสุด ที่ 260 นาโนเมตร โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จะมีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เท่ากับ 20 หน่วย (A_{260}) ดังนั้นสามารถคำนวณปริมาณของ กรดนิวคลีอิกได้จาก

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (mg/ml)} = A_{260} \times 1/20$$

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (ng/ } \mu\text{l)} = A_{260} \times 1/20 \times 1000$$

$$= A_{260} \times 50$$

กรณีที่ใส่สารละลายดีเอ็นเอเจือจาง 100 เท่า (ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร ต่อน้ำกลั่น 297 ไมโครลิตร) ในการตรวจสอบด้วยเครื่อง spectrophotometer จะสามารถคำนวณปริมาณ กรดนิวคลีอิกในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตรได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (ng/ } \mu\text{l)} = A_{260} \times 50 \times 100$$

1.2 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ออกแบบ

แยกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ ตามวิธีที่ประยุกต์จาก Yaish and Vega (2003) โดยมีวิธีการ ดังนี้

1.2.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของสับดูมาตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ (200 ng/ μ l) 5.0 ไมโครลิตร 10X Reaction Buffer 5.0 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* (10 U/ml) 1.0 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มี ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

1.2.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ adaptor โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดย สมบูรณ์ มาเชื่อมต่อเข้ากับ *MseI* adaptor โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 48.0 ไมโครลิตร *MseI* adaptor (12.5 pmol/μl) 8.0 ไมโครลิตร 10X T4 ligase buffer 4 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (1 U/μl) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 2 ชั่วโมง โดยลำดับเบสของ *MseI* adaptor คือ

5' GACGATGAGTCCTGAG 3'

3' TACTCAGGACTCAT 5'

1.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยนำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adaptor แล้ว มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 20.0 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ M1 (5' GACGATGAGTCCTGAG 3') (5 pmol/μl) 4.0 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 6.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 6.0 ไมโครลิตร MgCl₂ (50 mM) 0.6 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 U/μl) 0.4 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 60 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ ขั้นที่ 1 denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และ ขั้นที่ 3 extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยเทคนิค อิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

1.2.4 การแยกลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาทำ ไฮบริไดเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotinylated oligo) ทางด้านปลาย 5' ดังนี้ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CCT)₁₀ และ (ACC)₁₀ นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ พีซีอาร์มาเติม สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบชนิดต่าง ๆ โดยเติม สารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 1.2.3 ปริมาตร 56.0 ไมโครลิตร biotinylated oligo (5 pmol/μl) ซึ่งประกอบด้วย B-(CA)₁₅, B-(GA)₁₅, B-(CCT)₁₀ และ B-(ACC)₁₀ อย่างละ 2.0 ไมโครลิตร และ hybridization buffer 40.0 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิ ที่ใช้ในการไฮบริไดเซชัน เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

1.2.5 การเตรียม magnetic beads โดยดูด magnetic bead ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม binding and washing buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก (ระวังอย่าดูด magnetic bead ติดออกไป) (ทำซ้ำ 3-4 ครั้ง) หลังจากดูดสารละลายออกหมดแล้ว จึงเติม hybridization buffer ลงไป 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.2.6 การทำปฏิกิริยาระหว่างโพรบกับ magnetic bead โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 1.2.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย beads จากข้อ 1.2.5 ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง (ผสมให้เข้ากันทุก 30 นาที)

1.2.7 การชะดีเอ็นเอออกจาก beads โดยนำหลอดจากข้อ 1.2.6 วางลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก เติมสารละลาย 2XSSC และ 0.1 % SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก (ทำซ้ำ 1 ครั้ง) จากนั้นเติมสารละลาย 1X SSC และ 0.1 % SDS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก (ทำซ้ำ 1 ครั้ง) และเติมสารละลาย 1X SSC และ 0.1 % SDS ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก (ทำซ้ำ 1 ครั้ง) ล้างดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก magnetic beads โดยเติม TE ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงไป แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดใหม่อย่างรวดเร็ว

1.2.8 การทำให้ดีเอ็นเอเป็นสายคู่ และเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอ จากข้อ 1.2.7 ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ M1 (10 pmol/μl) 1.33 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร MgCl₂ (50 mM) 0.8 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 U/μl) 0.5 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับข้อ 1.2.3 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และนำผลผลิตพีซีอาร์มาทำหีบรีสุทซ์ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit

1.2.9 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด โดยเชื่อมต่อดีนส่วนดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด pGEM®-T Vector โดยใส่สารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 1.2.8 ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร 2X Ligation buffer 5.0 ไมโครลิตร พลาสมิด pGEM®-T Vector 1.0 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (400,000 U/μl) 1.0 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

1.2.10 การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เดิมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีคอมพิเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) โดยจุ่มลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย LB medium ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้เหลือประมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน และดูดสารละลาย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง LB agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 2 % X-gal และ 20 % IPTG นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.2.11 คัดเลือกโคโลนีสีขาว โดยเขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายเซลล์ไปตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดแทรกอยู่ด้วยวิธีพีซีอาร์ ตรวจสอบโคลนที่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์ด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยตัดแผ่นไนลอนเมมเบรน ขนาด 8 x 12 ตารางเซนติเมตร และตัดกระดาษกรองให้มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นไนลอนเมมเบรนเล็กน้อย จุ่มไนลอนเมมเบรนลงในน้ำกลั่นให้เปียกทั่วทั้งแผ่น แล้วจุ่มลงในสารละลาย 20X SSC วางแผ่นไนลอนเมมเบรนลงบนกระดาษกรองเพื่อซับน้ำออกพอหมาด ๆ จากนั้นจึงวางแผ่นไนลอนเมมเบรนลงบนพลาสติกใส ที่มีตำแหน่งของจุดที่จะหยดดีเอ็นเอ นำผลผลิตพีซีอาร์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพเป็นสายเดี่ยว แล้วย้ายหลอดใส่ในน้ำแข็งทันที เพื่อป้องกันการกลับมาจับกันของดีเอ็นเอเป็นสายคู่อีก และดูดผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นเมมเบรนไนลอนที่เตรียมไว้แล้ว จากนั้นตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับแผ่นเมมเบรนไนลอนโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 10 นาที นำมาทำไฮบริไดเซชันที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้ biotinylated oligo เป็นโพรบ และตรวจสอบผลโดยใช้ชุดตรวจสอบ North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit

1.2.12 คัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกมาสกัดพลาสมิด ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป High-Speed Plasmid Mini Kit แล้วส่งพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

1.2.13 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมส่วนไมโครแซทเทลไลต์โดยไพรเมอร์แต่ละเส้นมีความยาว 19-23 เบส และคำนวณค่า T_m ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้มีค่าใกล้เคียงกัน คัดเลือกไพรเมอร์ โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ มาตรวจสอบกับจีโนมิกดีเอ็นเอของสับดูดำ 2 ตัวอย่าง ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (60 ng/μl) 1.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward (5 pmol/μl) 1.25 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ reverse (5 pmol/μl) 1.25 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 0.625 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1.25 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 0.375 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/μl) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 1 รอบ สำหรับการคลายเกลียว และแยกสายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที และ 35 รอบ สำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ในรอบสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ มาตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสับดูดำ 125 ตัวอย่าง

1.2.14 ตรวจสอบผลด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลพอลิอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Caetano-Anolles (1997)

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับดูดำโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ไอเอสเอสอาร์

ทดสอบเบื้องต้นว่า ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยใช้ไอเอสเอสอาร์ ไพรเมอร์ ทั้งหมด 16 ชนิด กับสับดูดำ 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสับดูดำจากในประเทศ และต่างประเทศ คือ (หมายเลข 8) และสับดูดำพันธุ์สหรัฐอเมริกา (หมายเลข 31) คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอ จำนวนมาก และชัดเจนจำนวน 8 ชนิด มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (120 ng/ μ l) 1.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 pmol/ μ l) 1.25 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 0.75 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1.25 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 1.00 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1 รอบ สำหรับการคลายเกลียว และแยกสายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที และ 35 รอบ สำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที ในรอบสุดท้าย เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอ ที่สังเคราะห์ได้ มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้

3. การวิเคราะห์ผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และไอเอสเอสอาร์

บันทึกแถบดีเอ็นเอของสปีดัมที่ปรากฏบนลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และไอเอสเอสอาร์โดยอ่านแถบที่ปรากฏบนแผ่นเจลและบันทึกเป็นสัญลักษณ์ “1” เมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอและ “0” เมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k ซึ่งจะคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างสปีดัมแต่ละตัวอย่างและสร้างแผนภูมิพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (clustal analysis) ด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) และการคำนวณค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity: GS) ใช้วิธีของ Nei and Li (1979) ดังสมการ

$$S_{ij} = \frac{2a}{a + b + c}$$

เมื่อ S_{ij} = ค่า similarity ระหว่างพันธุ์ i และพันธุ์ j
 a = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้ง 2 พันธุ์
 b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ i แต่ไม่พบในพันธุ์ j
 c = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ j แต่ไม่พบในพันธุ์ i

คำนวณค่า Polymorphic Information Contents (PICs) ของแต่ละแถบดีเอ็นเอ หรือแต่ละ marker ค่า PICs เป็นค่าที่บอกโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 2 ตัวอย่างที่เลือกมาแบบสุ่ม

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

โดย P_i คือความถี่ของแอลลีลที่ i สำหรับ co-dominant marker และ P_i คือความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่งประกอบด้วย P_a (absent allele) และ P_p (present allele) สำหรับ dominant marker

4. การพัฒนาเครื่องหมายจำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในสบูดำ

4.1 การพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน

การพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน 6 ยีน ได้แก่ *KASIII*, *KASII*, *SAD*, *FatA*, *FAD3* และ *FAD6* โดยเก็บรวบรวมข้อมูลลำดับเบสรูปแบบ fasta ของยีนที่พบในพืช โดยค้นหาใน Entrez <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ของหน่วยงาน National Institute of Health (NIH) ประเทศสหรัฐอเมริกาโดยอ้างอิงข้อมูล lipid gene catalog ที่รวบรวมอยู่ในเว็บไซต์ <http://www.canr.msu.edu/Igc> ของ Department of Botany and Plant Pathology Michigan State University ประเทศสหรัฐอเมริกา โดย Sergei Mekhedov, Oscar Martinez de Ilárduya และ John Ohlrogge นำลำดับเบสของยีนต่าง ๆ ที่รวบรวมมา alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW 1.82 จาก <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> ของสถาบัน European Bioinformatics Institute (EBI) ประเทศอังกฤษ ดำเนินการ align ทั้ง 2 รูปแบบดังนี้ align ลำดับเบสที่เป็น cDNA และ genomic DNA และ align ลำดับเบสที่เป็น cDNA เพียงอย่างเดียว ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต่าง ๆ โดยใช้หลักการที่ว่า ความแตกต่างจะพบมากที่บริเวณ intron ดังนั้น ไพรเมอร์ที่ออกแบบจะคาบเกี่ยวบริเวณ exon-intron-exon หรือ ให้ครอบคลุมส่วนที่เป็น intron โดยมีไพรเมอร์อยู่ในส่วนของ exon และออกแบบไพรเมอร์ให้มีความยาวประมาณ 20-23 เบส มีค่า T_m ใกล้เคียงกันทั้ง 2 ทิศทางคือ forward (F) และ reverse (R) primers

4.2 การเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน

เมื่อได้ไพรเมอร์แล้วนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (60 ng/ μ l) 1.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward (5 pmol/ μ l) 1.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ reverse (5 pmol/ μ l) 1.0 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 0.5 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1.25 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 0.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 1 รอบสำหรับการคลายเกลียว และแยกสายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และ 35 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 61-65 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ในรอบสุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบปริมาณ และขนาดโดยเทคนิค

DFLP ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 115 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 90 นาที (ขึ้นกับขนาดของชิ้น DNA) แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV บันทึกผลรูปแบบของ AS-PCR

4.3 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยเทคนิค SSCP

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้ในสภาพสายเดี่ยวด้วยเทคนิค SSCP ดังนี้ นำผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 3-5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดพีซีอาร์ใหม่ เติม SSCP dye (95 % formamide, 0.01 M NaOH, bromphenol blue และ 0.05 % xylene cyanol) 9 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีเพื่อให้ดีเอ็นเอคงอยู่ในสภาพสายเดี่ยว และเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ชนิดที่ไม่มีส่วนผสมของสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (non-denaturing polyacrylamide gel) แผ่นเจลแนวตั้งขนาด 20X20 เซนติเมตร โดยเตรียมเจลไว้ล่วงหน้าประมาณ 2 ชั่วโมงเพื่อให้เจลแข็งตัวสม่ำเสมอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้เสียสภาพแล้ว มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แนวตั้ง ในสารละลาย 1X TBE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 10 วัตต์ ที่อุณหภูมิต่ำ นาน 10 ชั่วโมง ทั้งนี้ระยะเวลาจะขึ้นอยู่กับความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบผลโดยย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ดังนี้ แยกแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจกอย่างระมัดระวัง ใส่ในถาดพลาสติก เติม fixer (10 % เอทานอล, 0.5 % acetic acid) ให้ท่วม เช้าเบา ๆ นาน 5 นาที และเท fixer ออก แล้วย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (0.6 % ซิลเวอร์ไนเตรท ในสารละลาย fixer) เช้าเบา ๆ นาน 30 นาที เทสารละลายซิลเวอร์ไนเตรททิ้ง (เก็บในภาชนะที่เฉพาะ) และล้างด้วยน้ำกลั่น 20 วินาที และ 1 นาที เติมสารละลาย developer (5 % 10 N NaOH, 0.5 % formaldehyde) เช้าเบา ๆ เมื่อเจลเริ่มเปลี่ยนสี ให้เท developer เดิมทิ้ง แล้วเติม developer ใหม่ลงไป เช้าต่อไปจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน จากนั้นเท developer ทิ้ง แล้วเติม fixer ลงไปให้ท่วมเจล เช้าเบา ๆ นาน 10 นาที แล้วเท fixer ทิ้ง และล้างเจลด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จากแผ่นเจล แล้วตัดแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบแยกใส่หลอด microcentrifuge tube เพื่อนำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอชิ้นใหม่โดยวิธี PCR สามารถนำไปใช้หาลำดับเบสได้ ถ้าต้องการเก็บแผ่นเจลไว้ให้นำแผ่นเซลโลเฟน (cellophane) ที่เปียกประกบกับแผ่นเจลทั้งสองด้าน และระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จึงแผ่นเจลให้ตั้งทุกด้าน แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และบันทึกผลจำนวนรูปแบบของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยว

ผลและวิจารณ์

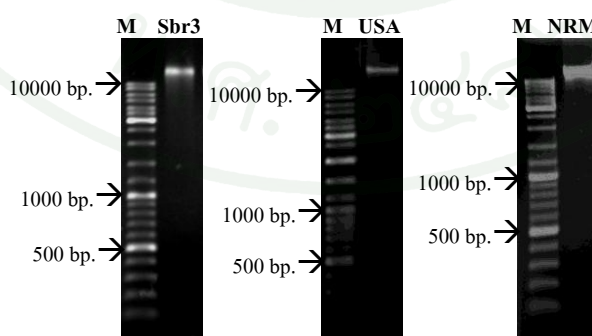
1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบสบู่ดำ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนสบู่ดำ รวมทั้งสบู่แดง และมะเขือหิน จำนวน 127 ตัวอย่าง วิเคราะห์คุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) พบว่าได้อดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี โดยมีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.8-1.9

2. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสบู่ดำ

2.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย

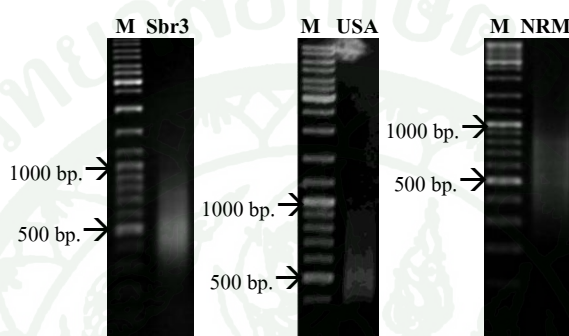
เลือกสบู่ดำจากในประเทศ และต่างประเทศ 3 ชนิด คือ พันธุ์ FF20 Sbr3 (Sbr3) หมายเลข 14 พันธุ์สหรัฐอเมริกา (USA) หมายเลข 31 และ พันธุ์นครราชสีมา 1 (NRM) หมายเลข 8 เพื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นสูง (ภาพที่ 2) และวัดการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer เพื่อตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอ พบว่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสง $A_{260}:A_{280}$ มีค่า 1.73, 1.82 และ 1.83 ตามลำดับ แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ ไม่มีอาร์เอ็นเอ หรือ โปรตีนปนเปื้อน



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอสบู่ดำด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส

[Sbr3 = สบู่ดำพันธุ์ FF20 Sbr3 (หมายเลข 14), NRM = สบู่ดำพันธุ์นครราชสีมา 1 (หมายเลข 8), USA = สบู่ดำพันธุ์สหรัฐอเมริกา (หมายเลข 31) และ M: แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน]

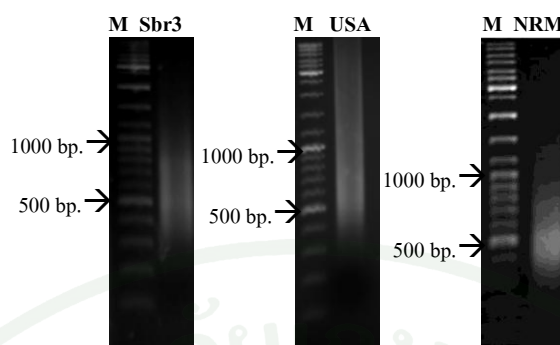
นำดีเอ็นเอของสับคำทั้ง 3 ตัวอย่าง มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะ smear ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอถูกตัดโดยสมบูรณ์ และได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 200-1,000 คู่เบส นำชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้มาต่อเข้ากับ *MseI* adaptor ตรวจสอบการเชื่อมต่อระหว่างชิ้นดีเอ็นเอกับ adaptor ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีลำดับเบสของ adaptor เป็นไพรเมอร์ เมื่อตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ามีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้น แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอสามารถเชื่อมต่อกับ adaptor ได้ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 จีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* และต่อด้วย adaptor หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

[Sbr3 = สับคำพันธุ์ FF20 Sbr3 (หมายเลข 14), NRM = สับคำพันธุ์นครราชสีมา 1 (หมายเลข 8), USA = สับคำพันธุ์สหรัฐอเมริกา (หมายเลข 31) และ M: แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน]

คัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ด้วยกระบวนการ enrichment โดยการไฮบริดซ์กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ ดังนี้ dinucleotide repeat 2 ชนิด คือ $(CA)_{15}$ และ $(GA)_{15}$ และ trinucleotide repeat 2 ชนิด คือ $(ACC)_{10}$ และ $(CCT)_{10}$ โดยโพรบแต่ละชนิดจะติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วยไบโอติน (biotinylated oligo) จึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เกาะกับโพรบได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่เคลือบบน magnetic bead เมื่อได้ดีเอ็นเอเป้าหมายแล้ว นำมาเพิ่มปริมาณ และทำให้เป็นสายคู่ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ภาพที่ 4) นำดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการ enrichment เพื่อคัดเลือกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเข้าไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์



ภาพที่ 4 ดีเอ็นเอที่ไฮบริดซ์กับไบโอตินโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ (GA)₁₅, (CA)₁₅, (ACC)₁₀ และ (CCT)₁₀ หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

[Sbr3 = สบู่ดำพันธุ์ FF20 Sbr3 (หมายเลข 14), NRM = สบู่ดำพันธุ์นครราชสีมา 1 (หมายเลข 8),

USA = สบู่ดำพันธุ์สหรัฐอเมริกา (หมายเลข 31) และ M: แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน]

2.2 การสร้างห้องสมุดจีโนม

เชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิด แล้วถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชัน พบว่าได้โคลนจากห้องสมุดจีโนมที่ใช้ dinucleotide และ trinucleotide repeat เป็นโพรบ จำนวน 996 โคลน คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ด้วยวิธีพีซีอาร์ ได้จำนวน 906 โคลน คิดเป็น 90.96 เปอร์เซ็นต์ของโคลนที่สุ่มเลือกมาทั้งหมด ตรวจสอบการมีชิ้นดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ในแต่ละโคลน โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ไปหยดลงบนเมมเบรนไนลอน เพื่อทำ dot blot hybridization เลือกโคลนที่สามารถไฮบริดซ์กับโพรบที่เป็นชุดซ้ำได้ชัดเจนบนแผ่นฟิล์มทั้งหมด 108 โคลน คิดเป็น 11.92 เปอร์เซ็นต์ของโคลนที่นำมาทำ dot blot hybridization จากนั้นนำโคลนที่ให้ผลบวกจากการทำ dot blot hybridization จำนวน 97 โคลน มาสกัดพลาสมิด ให้บริสุทธิ์ และส่งหาลำดับเบส สามารถนำลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ มาจำแนกเป็นกลุ่มคือ dinucleotide repeat, trinucleotide repeat, imperfect repeat และ compound repeat และพัฒนาไพรเมอร์ได้จำนวนทั้งสิ้น 38 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 จำนวนโคลนที่ได้จากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ชั้นต่าง ๆ จากห้องสมุดจีโนม

ขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์	ตัวอย่างของสับดูต้าที่ใช้			รวมทั้งหมด
	Sbr3	USA	NRM	
1. จำนวนโคลนที่ได้จากการ ทรานสฟอร์มเมชัน	602	78	316	996
2. จำนวนโคลนที่คัดเลือกได้จากการ ตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์	516	78	312	906 (90.96 เปอร์เซ็นต์)
3. จำนวนโคลนที่ให้ผลบวกจากการ ตรวจสอบด้วยวิธี dot blot hybridization	48	12	48	108 (11.92 เปอร์เซ็นต์)
4. จำนวนโคลนที่ส่งหาลำดับเบส	37	12	48	97 (9.73 เปอร์เซ็นต์)
5. จำนวนไพรเมอร์ที่ออกแบบได้	14	4	20	38

Sbr3 = สับดูต้าพันธุ์ FF20 Sbr3 (หมายเลข 14), NRM = สับดูต้าพันธุ์นครราชสีมา 1 (หมายเลข 8) และ USA = สับดูต้าพันธุ์สหรัฐอเมริกา (หมายเลข 31)

เมื่อพิจารณาลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่าง ๆ พบลำดับเบสชนิด dinucleotide repeat มากที่สุด คิดเป็น 37.93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น trinucleotide repeat คิดเป็น 24.14 เปอร์เซ็นต์ compound repeat คิดเป็น 29.33 เปอร์เซ็นต์ และ imperfect repeat คิดเป็น 8.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ที่พบมากที่สุดเป็น dinucleotide repeat ชนิด (GA)_n คิดเป็น 32.76 เปอร์เซ็นต์ของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด สอดคล้องกับรายงานที่พบในอะโวคาโด (Ashworth *et al.*, 2004) จากรายงานการสำรวจลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่าง ๆ พบว่า พืชส่วนใหญ่มีลำดับเบสซ้ำเป็นชนิด (AT)_n มากที่สุด รองลงมาก็คือ (GA)_n และ (CA)_n ตามลำดับ (Wang *et al.*, 1994; Lagercrantz *et al.*, 1993; Morgante and Oliveiri, 1993) แต่งานวิจัยนี้ไม่ได้ออกแบบโอลิโก นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ชนิด (AT)_n เนื่องจาก (AT)_n มักจะเกิดการจับกันเอง ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ที่พบมากรองลงมาเป็น ชนิดซ้ำ (GGA)_n โดยพบ 20.70 เปอร์เซ็นต์ของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด และพบลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ชนิด compound repeat และ imperfect repeat ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณใกล้เคียงกันเป็นส่วนใหญ่ ยกเว้น (GAA)_n(GGA)_n เป็น compound repeat ที่พบมากที่สุด ประมาณ 12.09 เปอร์เซ็นต์ของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด (ตารางที่ 3) โดยสามารถจำแนก

ลำดับเบสในโคลนต่าง ๆ ออกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ (1) ลำดับเบสซ้ำที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ และมีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่บริเวณตรงกลาง (2) ลำดับเบสที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ และมีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่บริเวณส่วนต้น หรือ ส่วนปลาย ทำให้ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ (3) ลำดับเบสที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ แต่ไม่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ และ (4) ลำดับเบสไม่สมบูรณ์โดยมีความบกพร่องจากการอ่านลำดับเบส

จากลำดับเบสที่ได้ พบว่ามีเฉพาะลำดับเบสกลุ่มที่ 1 เท่านั้น ที่สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะได้ สำหรับลำดับเบสกลุ่มที่ 2 นำมาออกแบบไพรเมอร์ไม่ได้ เนื่องจากลำดับเบสที่ขนานข้างลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์บริเวณ 5' หรือ 3' มีขนาดสั้นเกินไป ทั้งนี้ อาจเนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ไม่เหมาะสม โดยพบว่าลำดับเบสบริเวณขนานข้างของไมโครแซทเทลไลต์จำนวนมาก เป็นบริเวณที่มีเบส A และ T เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ (AT rich) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* มีบริเวณจดจำเป็น 5' T[▽]TAA 3' จึงทำให้บริเวณที่ขนานข้างของไมโครแซทเทลไลต์ถูกตัดออกไป Hamilton *et al.* (1999) แก้ปัญหานี้ได้โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด เพื่อเพิ่มโอกาสให้ได้ลำดับเบสที่ยาวขึ้น ส่วนลำดับเบสกลุ่มที่ 3 ซึ่งไม่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ แต่ก็พบว่ามีลำดับเบสบางส่วนที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ จึงอาจทำให้โพรบเข้าจับคู่ผิดได้ สำหรับลำดับเบสกลุ่มที่ 4 พบว่ามีลำดับเบสไม่สมบูรณ์ ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของพลาสมิดมากกว่า 1 ชนิด ทำให้เครื่องหาลำดับเบสไม่สามารถอ่านผลได้ นอกจากนี้ยังพบลำดับเบสที่ซ้ำกับกลุ่มที่ 1 และ 2 รวมทั้งยังพบโคลนที่มี 2 ลำดับเบสอยู่ร่วมกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากในขั้นตอนแรกของการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ คือ การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อกับ adaptor อาจทำได้โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดก่อนการเชื่อมต่อกับ adaptor ที่จำเพาะกับเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้น หรือ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียว แต่อาจตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ติดกับ adaptor ในขั้นตอนเดียวกัน เป็นต้น (สุรินทร์, 2552)

ตารางที่ 3 ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่าง ๆ ที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

ชนิดของไมโครแซทเทลไลต์	จำนวนโคลนที่ได้	เปอร์เซ็นต์ (โดยประมาณ)
Dinucleotide repeat (37.93 %)		
(GA) _n	19	32.76
(CA) _n	3	5.17
Trinucleotide repeat (24.14 %)		
(GGA) _n	12	20.70
(TCC) _n	1	1.72
(CAA) _n	1	1.72
Imperfect repeat (8.60 %)		
(GA) _n AA (GA) _n	1	1.72
(GA) _n GG (GA) _n	1	1.72
(CAA) _n CAG (CAA) _n	1	1.72
(GGA) _n GTA (GGA) _n	1	1.72
(GGA) _n TGA (GGA) _n	1	1.72
Compound repeat (29.33 %)		
(GT) _n (GA) _n	1	1.72
(GGA) _n (GA) _n	2	3.46
(GAA) _n (GGA) _n	7	12.09
(GGA) _n (GAG) _n	1	1.72
(GAA) _n (GGA) _n (GA) _n	1	1.72
(GGA) _n (GGT) _n (GGA) _n	2	3.46
(GAA) _n (GGA) _n (GGT) _n (GGA) _n (GAA) _n	1	1.72
(GA) _n GT(GA) _n (GGA) _n GA (GGA) _n	1	1.72
(GAA) _n GA (GGA) _n AGA (GGA) _n	1	1.72
รวม	58	100

นำลำดับเบสที่มีขึ้นดีเอ็นเอสออกแทรกสมบูรณ์ โดยมีลำดับเบสแบบ ไมโครแซทเทลไลต์อยู่ตรงกลางมาวิเคราะห์ เพื่อออกแบบไพรเมอร์ โดยแต่ละลำดับเบสจะ ออกแบบไพรเมอร์ 2 สาย คือ สาย forward primer (F) และสาย reverse primer (R) โดยให้ครอบคลุม ส่วนไมโครแซทเทลไลต์ ไพรเมอร์ที่ออกแบบควรมีความยาวประมาณ 18-30 เบส และต้องไม่มี ลำดับเบสที่ซ้ำกันเอง มีค่าอุณหภูมิหลอมตัว (T_m , melting temperature) ใกล้เคียงกัน ซึ่งคำนวณค่า โดยประมาณได้จากสูตร T_m (องศาเซลเซียส) = $2(A+T)+4(G+C)$ โดย A, T, C และ G คือ จำนวนเบส แต่ละชนิดที่มีในไพรเมอร์นั้น และมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 100-350 คู่เบส (สุรินทร์, 2545)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อออกแบบไพรเมอร์ พบว่าไม่มีลำดับเบสใดที่ซ้ำกันเลย โดยสามารถออกแบบไพรเมอร์จากห้องสมุดจีโนม จำนวน 37 โคลน นำไปพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะ ได้ทั้งหมด 38 คู่ไพรเมอร์ โคลนละอย่างน้อย 1 คู่ไพรเมอร์ โดยอาศัยหลักการออกแบบไพรเมอร์ ทั่วไป และโปรแกรมคอมพิวเตอร์ fastPCR นอกจากนี้ยังพบลำดับเบสจำนวนมากไม่สามารถ นำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ได้ เนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลต์อยู่ที่ปลายของขึ้นดีเอ็นเอ หรือ ลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียงไม่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบ ทั้งหมด มาทดสอบกับจีโนมดีเอ็นเอของสับดำจำนวน 2 ตัวอย่าง ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณ ส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ และพบว่าไพรเมอร์หลายคู่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่าง มีลักษณะผลแบบส้อม เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ไพรเมอร์บางคู่ไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ตามขนาด ที่กำหนด จึงต้องปรับสภาวะของการทำพีซีอาร์ โดยการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้น annealing และ ปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เพื่อให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะ นอกจากนี้ ยังพบว่าไพรเมอร์ จำนวนมากไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการ หรือ ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก อาจเนื่องจากสภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่เหมาะสม หรือ ไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่มี ความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งที่ต้องการ

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

คัดเลือกไพรเมอร์ 18 คู่ (ตารางที่ 4) ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจากไพรเมอร์ทั้งหมดที่ พัฒนา 38 คู่ มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสับดำทั้ง 125 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างสับดำที่รวบรวม จากในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ มุกดาหาร สุรินทร์ อำนาจเจริญ นครศรีธรรมราช พัทลุง อุบลราชธานี นครราชสีมา ร้อยเอ็ด บึงกาฬ เพชรบุรี จันทบุรี สุพรรณบุรี แพร่ ลำปาง สตูล ขอนแก่น ปทุมธานี ระยอง ชัยนาท พะเยา ประจวบคีรีขันธ์ เชียงใหม่ นครปฐม อุทัยธานี

ปราจีนบุรี หนองคาย พิชญ์โลก กาญจนบุรี กรุงเทพฯ เพชรบูรณ์ ชัยสิทธิ์ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุดรดิตถ์ น่าน ตาก ชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ และนครศรีธรรมราช ตัวอย่างที่รวบรวมจากต่างประเทศ จำนวน 10 ประเทศ ได้แก่ ประเทศอินเดีย สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ศรีลังกา สาธารณรัฐประชาชนจีน เขมร พม่า อินโดนีเซีย เปรู และเม็กซิโก โดยมี outgroup เป็นสมุนไพร และมะเขือเทศ กล้วยไฟรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอเพียง หนึ่ง แอลลีลต่อตำแหน่ง หรือ ต่อกล้วยไฟรเมอร์ และมีรูปแบบเดียว (monomorphism) ในสมุนไพรทุกตัวอย่าง ยกเว้นไฟรเมอร์ 5 คู่ คือ JC Sbr3_37, JC USA_12*, JC NRM_20*, JC NMR_147* และ JC NRM_221* ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยมีจำนวนแอลลีล 2 แอลลีล ต่อตำแหน่ง ระหว่างตัวอย่างสมุนไพร (*ไฟรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยมีจำนวนแอลลีล 2 แอลลีล ต่อตำแหน่ง หรือ ต่อกล้วยไฟรเมอร์ แต่ละตำแหน่งพบแอลลีลหนึ่งในกลุ่มตัวอย่างที่มีพืชจากประเทศไทย และต่างประเทศ และอีกแอลลีลพบในกลุ่มตัวอย่างไม่มีพืชจากประเทศเม็กซิโก เท่านั้น) (ภาพที่ 5 A และ B) โดยความเป็นพิษประเมินจากปริมาณสาร phorbol ester ในเมล็ด ถ้ามีปริมาณสารมากกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นพวกมีพิษ ถ้ามีปริมาณสารน้อยกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นพวกมีพิษน้อย หรือ ไม่มีพิษ สาร phorbol ester เป็นสารที่ทำให้เกิดอาการระคายเคือง เป็นสารเพิ่มฤทธิ์ของสารก่อมะเร็ง (ประโยชน์, 2549) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า สมุนไพรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ซึ่งไฟรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกลุ่มมีพิษ และไม่มีพิษ อาจใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบ่งชี้สมุนไพรที่มีพิษ และพันธุ์ไม่มีพิษได้ ซึ่งจะต้องตรวจสอบกับ สมุนไพรพันธุ์ทั้งมีพิษ และไม่มีพิษตัวอย่างอื่น เพิ่มขึ้น และวิเคราะห์ว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 ตำแหน่งเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษอย่างไร

นำผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสมุนไพรทั้งหมด 125 ตัวอย่าง ด้วยไฟรเมอร์ทั้ง 5 คู่ มาวิเคราะห์ค่า PICs (Polymorphic Information Contents) พบค่า PICs มีค่าอยู่ในช่วง 0.15-0.22 โดยมีค่า PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.21 เมื่อคำนวณค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ตามวิธีของ Nei and Li (1978) พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity) ตั้งแต่ 0.72-1.00 เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และสร้าง dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างสมุนไพรที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester สูง เป็นสมุนไพรที่พบโดยส่วนใหญ่ ประกอบด้วย สมุนไพรจากต่างประเทศ เช่น ประเทศอินเดีย สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ศรีลังกา สาธารณรัฐประชาชนจีน เขมร พม่า อินโดนีเซีย เปรู และจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ มุกดาหาร สุรินทร์ อำนาจเจริญ นครศรีธรรมราช พัทลุง อุบลราชธานี นครราชสีมา ร้อยเอ็ด ปัตตานี เพชรบุรี จันทบุรี แพร่

ลำปาง สตูล ขอนแก่น ปทุมธานี ระยอง ชัยนาท พะเยา ประจวบคีรีขันธ์ เชียงใหม่ นครปฐม
 อุทัยธานี ปราจีนบุรี หนองคาย พิชณุโลก กาญจนบุรี กรุงเทพฯ เพชรบูรณ์ ยโสธร นุรีรัมย์
 ศรีสะเกษ อุดรดิตถ์ น่าน ตาก ชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ และนครศรีธรรมราช และกลุ่มที่ 2
 ประกอบด้วย สบู่ดำพันธุ์ที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ หรือ ไม่มีสารพิษ
 ซึ่งเป็นสบู่ดำที่นำเข้ามาจากประเทศเม็กซิโก เพื่อนำมาปรับปรุงพันธุ์ แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ ดังนี้
 กลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย สบู่ดำพันธุ์สุขสันต์ 10 Krad, สบู่ดำพันธุ์พิชัย-พิเศษ, สบู่ดำพันธุ์
 วิชาญ-พิชัย 1-2, สบู่ดำพันธุ์สุขสันต์-พิชัย 1-2, สบู่ดำพันธุ์สุขสันต์ 1-4 และกลุ่มย่อยที่ 2.2
 ประกอบด้วย สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 1-6 (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ชนิดของลำดับเบสซ้ำที่อยู่ในระหว่างคู่ไพรเมอร์ ขนาดผลผลิต
พีซีอาร์ และค่า T_m ของไพรเมอร์ทั้ง 18 คู่ (* ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสับดูดำ)

No.	คู่ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ลำดับเบสซ้ำ	ขนาด (คู่เบส)	T_m (°C)
1.	JC Sbr3_12	F: ACCACCTTTTCAGAGCGGTAG R: TGACATTACCAAGTCCACGC	(GGA) ₇	272	55
2.	JC Sbr3_17	F: CGACCCATTTGATCAGTCCTA R: CATGCATTGTGATCTTGTGGC	(GA) ₁₆	185	57
3.	JC Sbr3_34	F: CTTTCATACAGAATGTCCAAC R: TTCTAGACGTCACCTGTAATCC	(GA) ₁₁	215	55
4.	JC Sbr3_35	F: CATCAGTGCCAATTTAGAAGT R: CAGCCATCTTGAAGGTTAGC	(GA) ₁₄	199	55
5.	JC Sbr3_37*	F: GGCTCGATTTGGTTGCTGT R: CGATCACGTCACAGTCGAA	(GA) ₂₁	133	53
6.	JC Sbr3_61-1	F: AACTGACCGTTGCGTTTCTC R: GATAATGACGATGGCAGCGA	CAAAA และ (GAA) ₁₀ (GGA) ₄ (GGT) ₂ (GGA) ₃ (GAA) ₇	230	55
7.	JC Sbr3_61-2	F: TGGGTATGGATTGATATTACC R: GAGAAACGCAACGGTCAGTT	(GAA) ₁₀ (GGA) ₄ (GGT) ₂ (GGA) ₃ (GAA) ₇	176	55
8.	JC Sbr3_69-1	F: GAGGCTGTGTTCCACCTATG R: TCAGGCAGATGTCTTCACATG	(GA) ₂₀	167	57
9.	JC Sbr3_86	F: GGACCTTGACGATGAGTCC R: CATAGCCATCCAATTAGGGGA	(GAA) ₆ (GGA) ₇	230	55
10.	JC USA_12*	F: GTCTCCAAATGCAGATC R: AGTAGCAGAAGCAGTAC	(CAA) ₃ CAG (CAA) ₇	208	55
11.	JC USA_40	F: AGCATGCAACACAGAAGCAG R: CCCAAATCTCATTCCTCTC	(GA) ₁₄	240	57
12.	JC NRM_17	F: GATTGGTGCTGTTGTGAAGG R: TAAGACTGCTGGATAGTCTAC	(GGA) ₃ TGA(GGA) ₇ TGA(GGA) ₇	313	59
13.	JC NRM_20*	F: CCACTCTCCTACAATCATCCAC R: GTCGGTATACTACCTCCCATTC	(GAA) ₄ (GGA) ₁₂	271	59

ตารางที่ 4 (ต่อ)

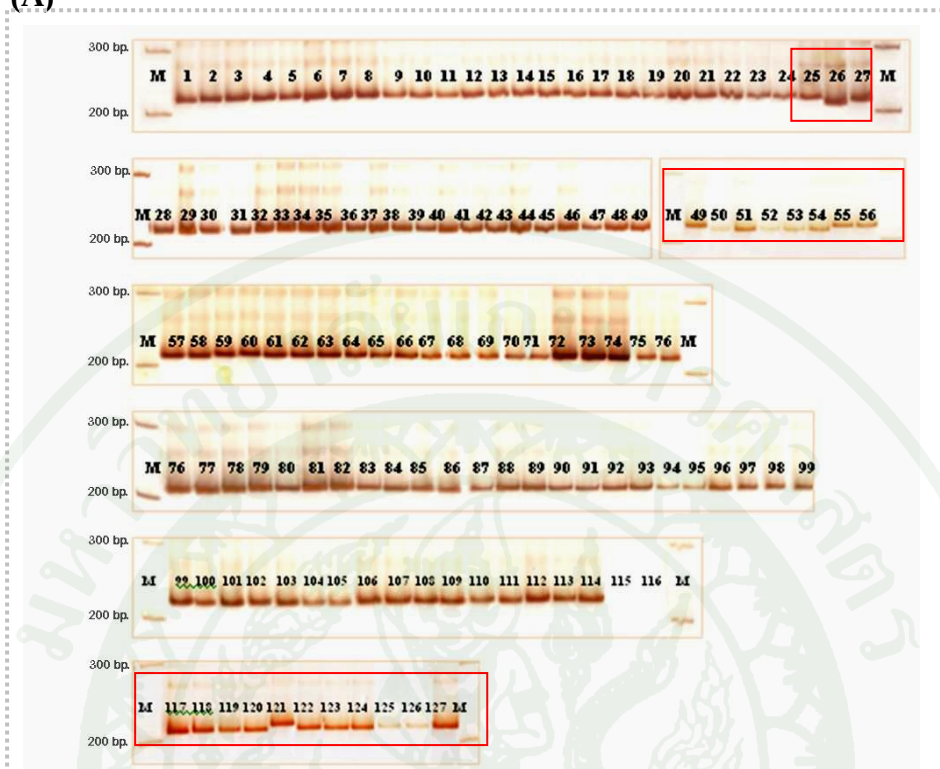
No.	คู่มือ	ลำดับเบส (5'-3')	ลำดับเบสซ้ำ	ขนาด (คู่เบส)	T _a (°C)
14	JC NRM_22	F: CTTCTTCCTAGCAGAGATG R: TGGTGTTTTAGATAGCACAC	(GA) ₂₃	153	55
15	JC NRM_58	F: AGCCATCTTGAAGGTTAGC R: CATCAGTGCCAATTTAGAAG	(GA) ₁₅	198	55
16	JC NRM_85	F: TCGGAGGGTCCGCTAAGTCG R: GACAGCCCAATGACAGACCTC	(GA) ₈	323	57
17	JC NRM_147*	F: CACAATTCTCCAGATGGCTCC R: TGCAACCGCAATACACGACG	(GAA) ₄ GA (GGA) ₂ AGA(GGA) ₈	205	57
18	JC NRM_221*	F: TGACACAGCAAGTGCACAAC R: TCACTATCCCTACTGCAGCT	(GT) ₁₀ (GA) ₂₂	234	55

ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของสับดูด้วยคิวไพรเมอร์ (A) JC USA_12 และ

(B) JC NRM_20 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

[1 = สับดูแอนนา 16, 2 = สับดูแอนนา 20/1, 3 = สับดูแอนนา 33/1, 4 = สับดูแอนนา 34/8, 5 = สับดูแอนนา 78/9, 6 = สับดูแอนนา 80/3, 7 = สับดูแอนนา 27/4, 8 = สับดูอันครราชสีมา 1, 9 = สับดูแอนนา 18/3, 10 = สับดูแอนนา 83/5, 11 = สับดูแอนนา 69/1, 12 = สับดูแอนนา 6/8, 13 = สับดู FF25B-14, 14 = สับดู FF20-Sbr-3, 15 = สับดู E-L-23, 16 = สับดูจันทบุรี, 17 = สับดูด้านช้าง สุพรรณบุรี, 18 = สับดู 108-21-50, 19 = สับดู 101-32-115, 20 = สับดูอันครราชสีมา 2, 21 = สับดูสตูล-อินเดีย, 22 = สับดู M 6 - F US/1, 23 = สับดู M 54 -F 26/1, 24 = สับดู JD, 25 = สับดูมุกดาหาร 10 Krad, 26 = สับดูสุสันต์ 10 Krad, 27 = สับดู 300 Krad 1, 28 = สับดู 300 Krad 2, 29 = สับดู 300 Krad 3, 30 = สับดูสหรัฐ 8.45 Krad, 31 = สับดูสหรัฐอเมริกา, 32 = สับดูสาวาย, 33 = สับดูสุรินัม (Surinume), 34 = สับดูอินเดีย 1, 35 = สับดูอินเดีย 2, 36 = สับดูอินเดีย 3 (Chennai), 37 = สับดูอินเดีย 4, 38 = สับดูอินเดีย 5 (ราชาน), 39 = สับดูอินเดีย 6 (D1), 40 = สับดูอินเดีย 7, 41 = สับดูลาว, 42 = สับดูศรีลังกา 1, 43 = สับดูศรีลังกา 2, 44 = สับดูจีน, 45 = สับดูจีน (แอนนา), 46 = สับดูแซมร, 47 = สับดูพม่า 1, 48 = สับดู พม่า 2, 49 = สับดู อินโดนีเซีย, 50 = สับดู พิษย์-พิเศษ, 51 = สับดู สุสันต์ 1, 52 = สับดู สุสันต์ 2, 53 = สับดู สุสันต์ 3, 54 = สับดู สุสันต์ 4, 55 = สับดู สุสันต์ 5, 56 = สับดูสุสันต์ 6, 57 = สับดูพิษณุโลก, 58 = สับดูสตูล, 59 = สับดูขอนแก่น, 60 = สับดู ปทุมธานี, 61 = สับดูมุกดาหาร, 62 = สับดูระยอง, 63 = สับดู ม.ก., 64 = สับดูชัยนาท, 65 = สับดูพะเยา, 66 = สับดูอันครราชสีมา 3, 67 = สับดูอันครราชสีมา 4, 68 = สับดูประจวบคีรีขันธ์, 69 = สับดูไบต่าง, 70 = สับดูแอนนา 21/7, 71 = สับดู 4 เมล็ด, 72 = สับดูเชียงใหม่, 73 = สับดูอันครปฐม, 74 = สับดูอินเดีย 8, 75 = สับดูอินเดีย 9, 76 = สับดูอุทัยธานี, 77 = สับดูปราจีนบุรี, 78 = สับดูหนองคาย, 79 = สับดูลำปาง, 80 = สับดูกาญจนบุรี, 81 = สับดูเพชรบูรณ์, 82 = สับดูแอนนา 14/5, 83 = สับดูแอนนา 24/2, 84 = สับดูแอนนา 31/2, 85 = สับดู แอนนา 36/2, 86 = สับดูแอนนา 49, 87 = สับดูแอนนา 52, 88 = สับดูแอนนา 67, 89 = สับดูแอนนา 74/1, 90 = สับดู แอนนา 75/8, 91 = สับดู แอนนา 86/2, 92 = สับดู แอนนา 87/1, 93 = สับดูอันครสวรรค์, 94 = สับดูทองสุพรรณ, 95 = สับดู 19-19-109, 96 = สับดู 72-19-8, 97 = สับดู 1-32-8, 98 = สับดู 84-10-53, 99 = สับดู 34-14-30, 100 = สับดู 107-10-57, 101 = สับดู 95-32-107, 102 = สับดู 4-18-36, 103 = สับดูหัวหิน, 104 = สับดูอันครราชสีมา 5, 105 = สับดูพม่า 3, 106 = สับดูพม่า 4, 107 = สับดูพม่า 5, 108 = สับดูพม่า 6, 109 = สับดู M 6 - F US/2, 110 = สับดู M 54 - F 26/2, 111 = สับดู JA, 112 = สับดู JB, 113 = สับดู JC, 114 = สับดู JE, 115 = สับดูแดง, 116 = มะเขากิน, 117 = สับดูวิชาญ-พิษย์ 1, 118 = สับดูสุสันต์-พิษย์ 1, 119 = สับดูสุสันต์อุทอง 1, 120 = สับดูสุสันต์อุทอง 3, 121 = สับดูผลรี, 122 = สับดูวิชาญ-พิษย์ 2, 123 = สับดูสุสันต์-พิษย์ 2, 124 = สับดูสุสันต์อุทอง 2, 125 = สับดู สุสันต์อุทอง 4, 126 = สับดูสุสันต์อุทอง 5 และ 127 = สับดูสุสันต์อุทอง 6]

(A)

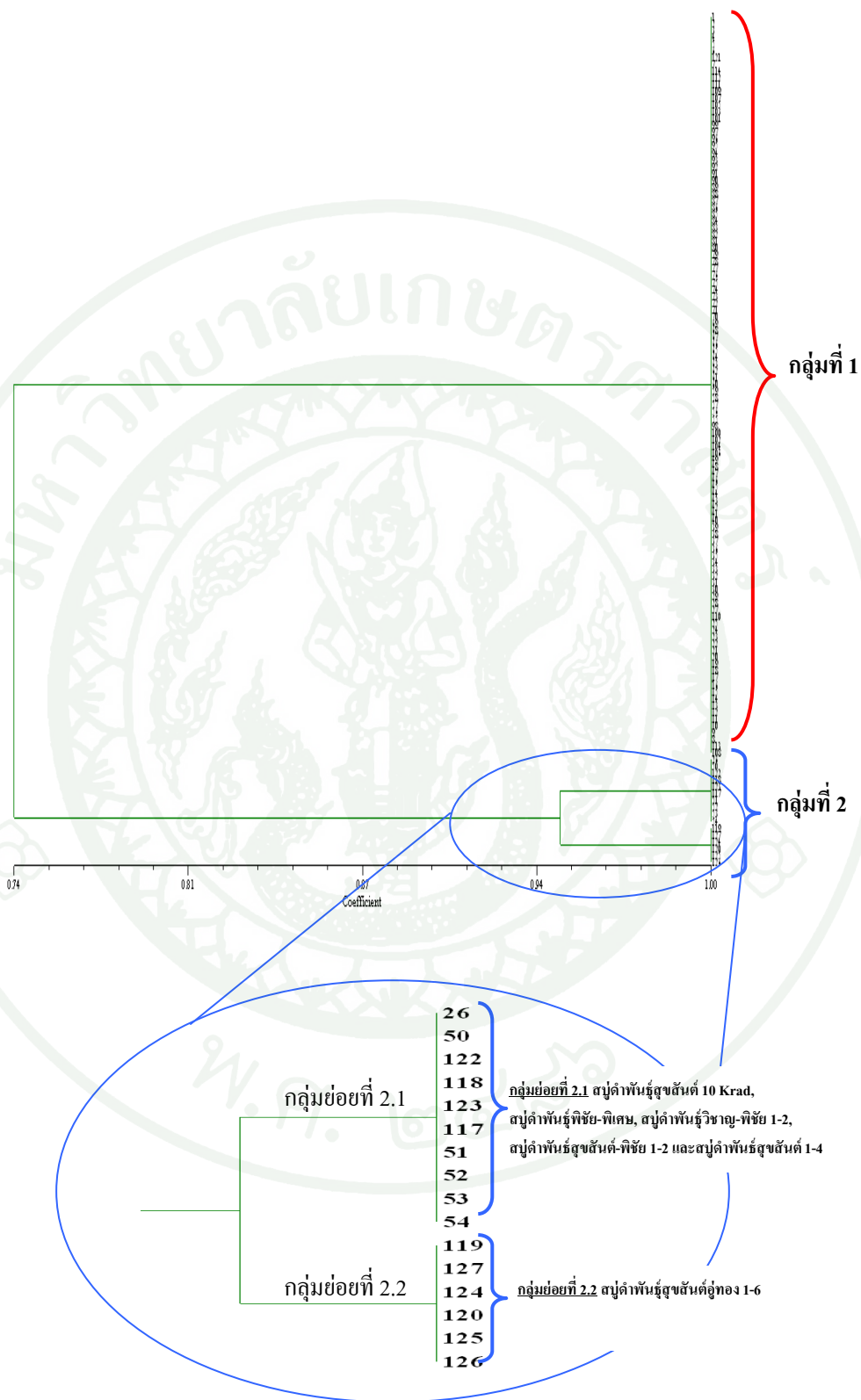


(B)



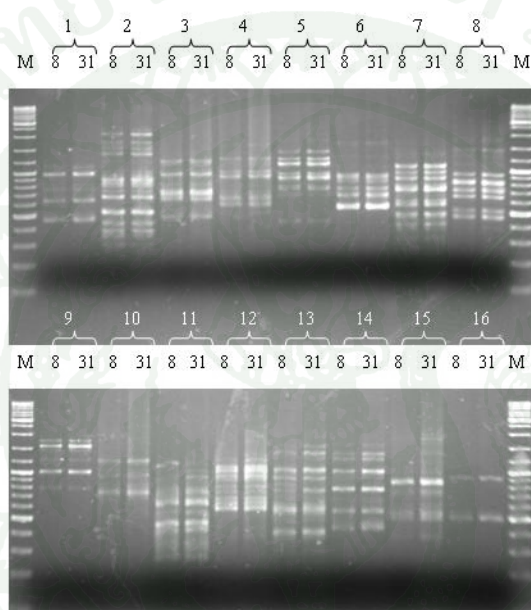
ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างของสับดำ 125 ตัวอย่าง สร้างโดยอาศัยข้อมูลจาก เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้วิธี UPGMA ในโปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k

[1 = สับดำแอนนา 16, 2 = สับดำแอนนา 20/1, 3 = สับดำแอนนา 33/1, 4 = สับดำแอนนา 34/8, 5 = สับดำแอนนา 78/9, 6 = สับดำแอนนา 80/3, 7 = สับดำแอนนา 27/4, 8 = สับดำนครราชสีมา 1, 9 = สับดำแอนนา 18/3, 10 = สับดำแอนนา 83/5, 11 = สับดำแอนนา 69/1, 12 = สับดำแอนนา 6/8, 13 = สับดำ FF25B-14, 14 = สับดำ FF20-Sbr-3, 15 = สับดำ E-L-23, 16 = สับดำจันทบุรี, 17 = สับดำ ด้านช้าง สุพรรณบุรี, 18 = สับดำ 108-21-50, 19 = สับดำ 101-32-115, 20 = สับดำนครราชสีมา 2, 21 = สับดำสตูล-อินเดีย, 22 = สับดำ M 6 - F US/1, 23 = สับดำ M 54 -F 26/1, 24 = สับดำ JD, 25 = สับดำมุกดาหาร 10 Krad, 26 = สับดำสุขสันต์ 10 Krad, 27 = สับดำ 300 Krad 1, 28 = สับดำ 300 Krad 2, 29 = สับดำ 300 Krad 3, 30 = สับดำสหรัฐ 8.45 Krad, 31 = สับดำ สหรัฐอเมริกา, 32 = สับดำฮาวาย, 33 = สับดำสุรินัม (Surinume), 34 = สับดำอินเดีย 1, 35 = สับดำ อินเดีย 2, 36 = สับดำอินเดีย 3 (Chennai), 37 = สับดำอินเดีย 4, 38 = สับดำอินเดีย 5 (ราชสถาน), 39 = สับดำอินเดีย 6 (D1), 40 = สับดำอินเดีย 7, 41 = สับดำลาว, 42 = สับดำศรีลังกา 1, 43 = สับดำศรีลังกา 2, 44 = สับดำจีน, 45 = สับดำจีน (แอนนา), 46 = สับดำเขมร, 47 = สับดำพม่า 1, 48 = สับดำ พม่า 2, 49 = สับดำ อินโดนีเซีย, 50 = สับดำ พิษณุ-พิเศษ, 51 = สับดำ สุขสันต์ 1, 52 = สับดำ สุขสันต์ 2, 53 = สับดำ สุขสันต์ 3, 54 = สับดำ สุขสันต์ 4, 55 = สับดำ สุขสันต์ 5, 56 = สับดำสุขสันต์ 6, 57 = สับดำพิษณุโลก, 58 = สับดำสตูล, 59 = สับดำขอนแก่น, 60 = สับดำ ปทุมธานี, 61 = สับดำมุกดาหาร, 62 = สับดำระยอง, 63 = สับดำ ม.ก., 64 = สับดำชัยนาท, 65 = สับดำพะเยา, 66 = สับดำนครราชสีมา 3, 67 = สับดำนครราชสีมา 4, 68 = สับดำประจวบคีรีขันธ์, 69 = สับดำไบ่ต่าง, 70 = สับดำแอนนา 21/7, 71 = สับดำ 4 เมล็ด, 72 = สับดำเชียงใหม่, 73 = สับดำนครปฐม, 74 = สับดำอินเดีย 8, 75 = สับดำอินเดีย 9, 76 = สับดำอุทัยธานี, 77 = สับดำปราจีนบุรี, 78 = สับดำหนองคาย, 79 = สับดำลำปาง, 80 = สับดำกาญจนบุรี, 81 = สับดำเพชรบูรณ์, 82 = สับดำแอนนา 14/5, 83 = สับดำแอนนา 24/2, 84 = สับดำแอนนา 31/2, 85 = สับดำ แอนนา 36/2, 86 = สับดำแอนนา 49, 87 = สับดำแอนนา 52, 88 = สับดำแอนนา 67, 89 = สับดำแอนนา 74/1, 90 = สับดำ แอนนา 75/8, 91 = สับดำ แอนนา 86/2, 92 = สับดำ แอนนา 87/1, 93 = สับดำนครสวรรค์, 94 = สับดำทองสุพรรณ, 95 = สับดำ 19-19-109, 96 = สับดำ 72-19-8, 97 = สับดำ 1-32-8, 98 = สับดำ 84-10-53, 99 = สับดำ 34-14-30, 100 = สับดำ 107-10-57, 101 = สับดำ 95-32-107, 102 = สับดำ 4-18-36, 103 = สับดำหัวหิน, 104 = สับดำนครราชสีมา 5, 105 = สับดำพม่า 3, 106 = สับดำพม่า 4, 107 = สับดำพม่า 5, 108 = สับดำพม่า 6, 109 = สับดำ M 6 - F US/2, 110 = สับดำ M 54 - F 26/2, 111 = สับดำ JA, 112 = สับดำ JB, 113 = สับดำ JC, 114 = สับดำ JE, 115 = สับดำแดง, 116 = มะเขือหิน, 117 = สับดำวิชาญ-พิษณุ 1, 118 = สับดำ สุขสันต์-พิษณุ 1, 119 = สับดำสุขสันต์อุทอง 1, 120 = สับดำสุขสันต์อุทอง 3, 121 = สับดำพลี, 122 = สับดำวิชาญ-พิษณุ 2, 123 = สับดำสุขสันต์-พิษณุ 2, 124 = สับดำสุขสันต์อุทอง 2, 125 = สับดำ สุขสันต์อุทอง 4, 126 = สับดำสุขสันต์อุทอง 5 และ 127 = สับดำสุขสันต์อุทอง 6]



3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับดูดำด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

จากการทดสอบไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์จำนวน 16 ชนิด กับสับดูดำ 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็น สับดูดำจากในประเทศ และต่างประเทศ คือ สับดูดำพันธุ์นครราชสีมา 1 หมายเลข 8 และสับดูดำพันธุ์สหรัฐอเมริกา หมายเลข 31 ที่ใช้ตรวจสอบเบื้องต้น และเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และชัดเจน จำนวน 8 ชนิด (ภาพที่ 7) นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในตัวอย่าง สับดูดำ 67 ตัวอย่าง พบไพรเมอร์ 7 ชนิดที่ให้ความแตกต่างระหว่างสับดูดำพันธุ์ที่มีพิษ และไม่มีพิษได้



ภาพที่ 7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ 16 ชนิดกับสับดูดำ 2 ตัวอย่าง คือ สับดูดำพันธุ์นครราชสีมา 1 (หมายเลข 8) และสับดูดำพันธุ์สหรัฐอเมริกา (หมายเลข 31)

- | | | | |
|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1. (TC) ₈ RT | 2. (AC) ₈ YG* | 3. (CA) ₈ G* | 4. (CA) ₈ A |
| 5. HVH(CT) ₇ * | 6. (CT) ₈ G** | 7. (GA) ₈ C* | 8. (AC) ₈ G* |
| 9. (TC) ₈ G | 10. (GT) ₉ A | 11. (AG) ₈ G | 12. (AGC) ₅ |
| 13. (AG) ₈ T* | 14. (ATG) ₅ * | 15. (CAA) ₅ | 16. (GATA) ₄ |

หมายเหตุ * ไพรเมอร์ที่คัดเลือก โดยให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่มีพิษ และไม่มีพิษ

** ไพรเมอร์ที่คัดเลือก โดยให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และชัดเจน แต่ไม่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่มีพิษ และไม่มีพิษ

จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มข้น และเข้มข้นปานกลางของแต่ละไพรเมอร์ พบอยู่ระหว่าง 7-19 แถบ (ตารางที่ 5) ภายหลังการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 8 ชนิด กับตัวอย่างสำเนา 67 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 96 แถบ เฉลี่ย 12 แถบต่อชนิดของไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสำเนา (polymorphic bands) จำนวน 16 แถบ และแถบดีเอ็นเอ ที่ไม่ให้ความแตกต่าง (monomorphic bands) จำนวน 80 แถบ โดยไพรเมอร์ (AC)₈YG ให้จำนวน แถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 19 แถบ และไพรเมอร์ (CA)₈G ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 7 แถบ ขนาดดีเอ็นเอที่พบอยู่ในช่วง ประมาณ 0.3- 2.5 กิโลเบส (ภาพที่ 8 และ 9) ค่า PICs ของแถบดีเอ็นเอ ทั้ง 96 แถบ มีค่าอยู่ในช่วง 0.00-0.36 โดยมีค่า PICs เฉลี่ย เท่ากับ 0.06 เมื่อคำนวณค่าความคล้ายคลึง ทางพันธุกรรมตามวิธีของ Nei and Li (1978) พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม มีค่า 0.91-1.00 โดยเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และสร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k สามารถจำแนกตัวอย่างที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (ภาพที่ 10 B) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างสำเนาพันธุ์ที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester สูง จัดเป็นสำเนาที่พบ ส่วนใหญ่ และกลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วย กลุ่มสำเนาพันธุ์ที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester ประกอบด้วย สำเนาที่นำเข้ามาจากประเทศเม็กซิโก เพื่อนำมาปรับปรุง พันธุ์ ได้แก่ สำเนาพันธุ์สุขสันต์ 10 Krad, สำเนาพันธุ์พิชัย-พิเศษ, สำเนาพันธุ์วิชาญ-พิชัย 1-2, สำเนาพันธุ์สุขสันต์-พิชัย 1-2, สำเนาพันธุ์สุขสันต์ 1-4 และสำเนาพันธุ์สุขสันต์อุทอง 1-6

ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Basha and Sujatha (2007) สามารถจำแนกสำเนาจาก ประเทศอินเดีย และเม็กซิโก โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR จำนวน 100 ชนิด ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ แต่พบเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เพียง 29 ชนิด ที่ให้ความแตกต่าง ระหว่างตัวอย่างสำเนา มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.573-0.970 แต่อย่างไรก็ตาม การจำแนกพันธุ์สำเนาทั้ง 67 ตัวอย่าง โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมายโมเลกุล ไอเอสเอสอาร์ ในการทดลองครั้งนี้ ยังไม่สามารถแบ่งกลุ่มสำเนาตามชนิดพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มยังมี จำนวนน้อย

ตารางที่ 5 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในสบูดำจากไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์แต่ละชนิด และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ทำให้ความแตกต่าง

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ *	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ ที่พบทั้งหมด	จำนวน polymorphic band	% polymorphic band
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(AC) ₈ YG	19	3	15.78
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(CA) ₈ G	7	2	28.57
di-nucleotide, 5'-anchor primer	HVH(CT) ₇	14	3	21.42
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(CT) ₈ G	8	-	-
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(GA) ₈ C	12	3	25.00
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(AC) ₈ G	11	2	18.18
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(AG) ₈ T	11	2	18.18
nonanchored primer	(ATG) ₅	14	1	7.14
รวม		96	16	

* Y = C หรือ T, H = A, C หรือ T และ V = A, C หรือ G

เลือกข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบูดำ 67 ตัวอย่าง ที่ใช้ทั้งเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และไอเอสเอสอาร์ นำมาวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมร่วมกัน ตามวิธีของ Nei and Li (1978) พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม มีค่าตั้งแต่ 0.88-1.00 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และสร้าง dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (ภาพที่ 10 C) พบว่ามีการจัดกลุ่มเหมือนกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (ภาพที่ 10 A) คือ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างสบูดำพันธุ์ที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester สูง และกลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างสบูดำพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศเม็กซิโก ที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย สบู่ดำพันธุ์สุขสันต์ 10 Krad, สบู่ดำพันธุ์พิชัย-พิเศษ, สบู่ดำพันธุ์วิชาญ พิชัย 1-2, สบู่ดำพันธุ์สุขสันต์-พิชัย 1-2 และสบู่ดำพันธุ์สุขสันต์ 1-4 และกลุ่มย่อยที่ 2.2 คือ สบู่ดำพันธุ์สุขสันต์อุทอง 1-6

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสบู่ดำ 67 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และไอเอสเอสอาร์ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มสบู่ดำออกเป็นสองกลุ่มด้วยกัน แต่เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไม่สามารถจำแนกภายในกลุ่มสบู่ดำพันธุ์ที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester ได้ ส่วนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สามารถจำแนกสบู่ดำพันธุ์ที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester ออกเป็นสองกลุ่มย่อยได้ ไพรมอร์ไอเอสเอสอาร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ส่วนใหญ่เป็นลำดับเบส 2 ซ้ำ และมีการเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3' (di-nucleotide, 3'-anchor primer) ดังนั้นความแปรผันของแถบดีเอ็นเอที่พบจะเกิดจากลำดับเบสที่อยู่ระหว่างไพรมอร์ชุดซ้ำเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ที่ใช้ไพรมอร์ที่เป็นลำดับเบสซ้ำที่มีการเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 5' (5'-anchor primer) ความแปรผันของแถบดีเอ็นเอที่พบจะเกิดจากลำดับเบสที่อยู่ระหว่างไพรมอร์ชุดซ้ำ และจำนวนชุดของลำดับเบสซ้ำ ซึ่งให้ความแปรผันของแถบดีเอ็นเอมากกว่า โดยทั่วไปเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูงในสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีสาเหตุจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ หรือ การเพิ่มขึ้นของลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์ ที่เกิดจากกลไกต่าง ๆ ซึ่งถือว่ามียัตราการสูงกว่าลำดับเบสบริเวณอื่น ๆ จึงสามารถจำแนกภายในสบู่ดำพันธุ์ที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester ได้ ดังนั้นในการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ จึงควรเพิ่มจำนวนไพรมอร์ที่เป็นลำดับเบสซ้ำที่มีการเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 5' ในการศึกษาให้มากขึ้น เป็นการเพิ่มโอกาสของการพบความหลากหลายระหว่างตัวอย่างให้สูงขึ้น

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ สิริศักดิ์ (2550) ที่ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสบู่ดำ 134 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี จำนวน 10 คู่ไพรมอร์ พบว่าสามารถจัดกลุ่มสบู่ดำในประเทศไทย และจากต่างประเทศ เป็น 8 กลุ่มย่อย ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.94-1.00 ซึ่งสามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของสบู่ดำได้มากกว่าเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ และไอเอสเอสอาร์ เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอปริมาณมาก ซึ่งเกิดจากตำแหน่งของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ *MseI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส จากความเหมาะสมของตำแหน่งการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ทั้ง 2 ซึ่งจะกระจายได้ทั่วทั้งจีโนม

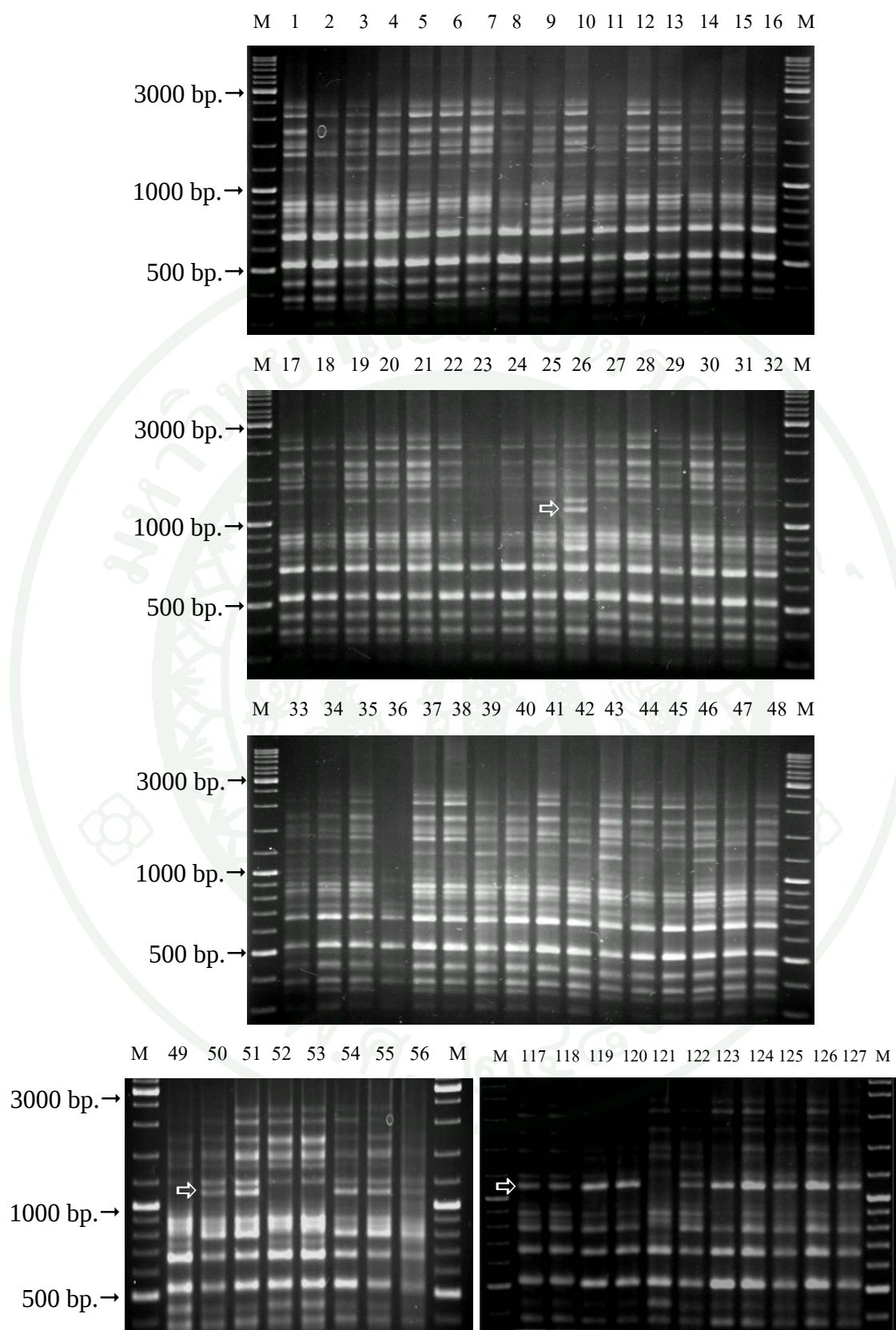
(genome) และมีจำนวนจุดตัดมากมาย ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ผลจำนวนมาก ดังนั้นในเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และไอเอสเอสอาร์ จึงควรเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ในการศึกษา เพื่อให้ครอบคลุมตำแหน่งต่าง ๆ ในจีโนมของสุนัขดำให้มากขึ้น



ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบสีเอนจากการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (AC)₈YG สบู่ดำ

67 ตัวอย่าง (M = แถบสีเอนมาตรฐาน)

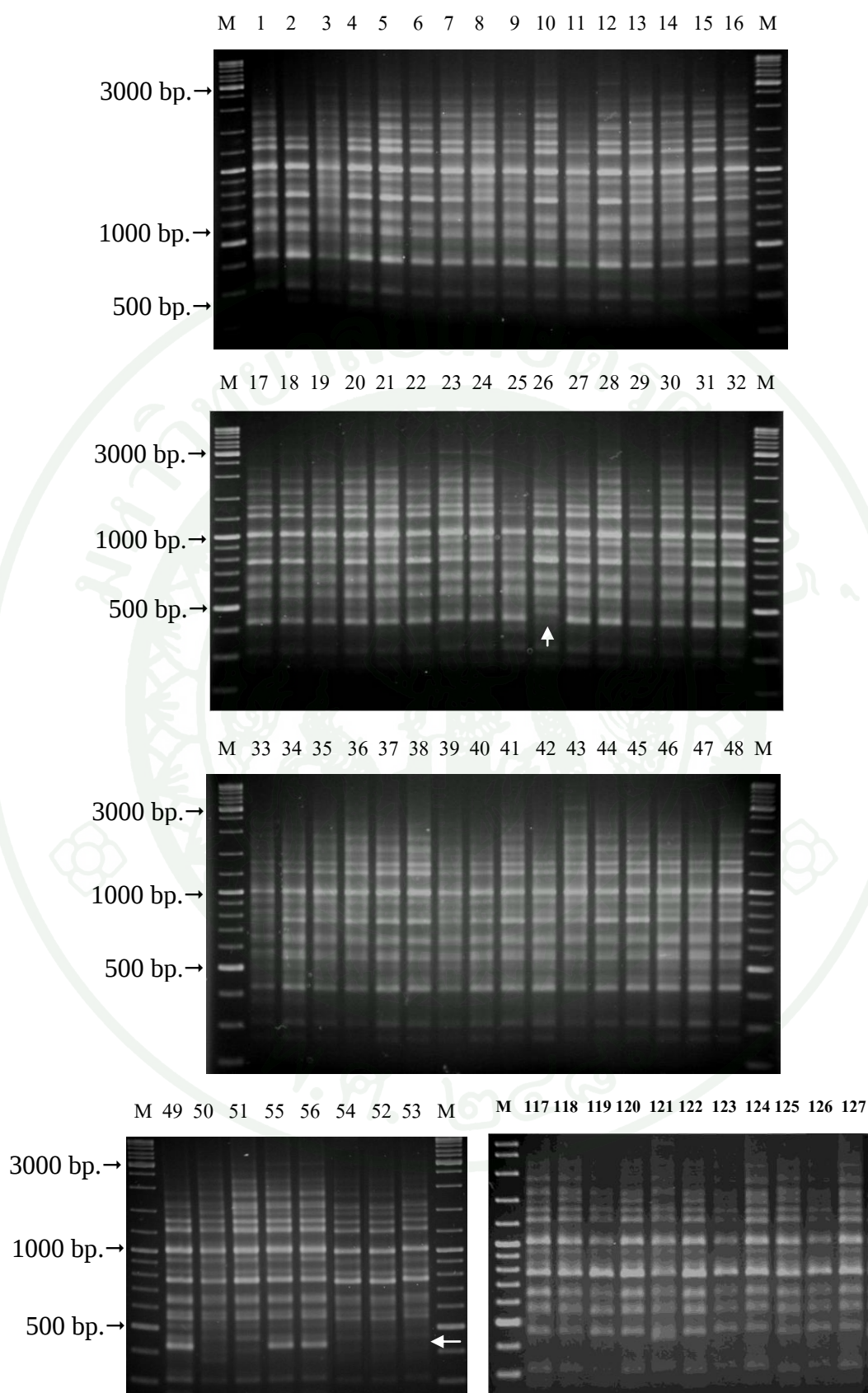
[1 = สบู่ดำแอนนา 16, 2 = สบู่ดำแอนนา 20/1, 3 = สบู่ดำแอนนา 33/1, 4 = สบู่ดำแอนนา 34/8,
5 = สบู่ดำแอนนา 78/9, 6 = สบู่ดำแอนนา 80/3, 7 = สบู่ดำแอนนา 27/4, 8 = สบู่ดำนครราชสีมา 1,
9 = สบู่ดำแอนนา 18/3, 10 = สบู่ดำแอนนา 83/5, 11 = สบู่ดำแอนนา 69/1, 12 = สบู่ดำแอนนา 6/8,
13 = สบู่ดำ FF25B-14, 14 = สบู่ดำ FF20-Sbr-3, 15 = สบู่ดำ E-L-23, 16 = สบู่ดำจันทบุรี, 17 = สบู่ดำ
ด่านช้าง สุพรรณบุรี, 18 = สบู่ดำ 108-21-50, 19 = สบู่ดำ 101-32-115, 20 = สบู่ดำนครราชสีมา 2,
21 = สบู่ดำสตูล-อินเดีย, 22 = สบู่ดำ M 6 - F US/1, 23 = สบู่ดำ M 54 -F 26/1, 24 = สบู่ดำ JD,
25 = สบู่ดำมุกดาหาร 10 Krad, 26 = สบู่ดำสุขสันต์ 10 Krad, 27 = สบู่ดำ 300 Krad 1,
28 = สบู่ดำ 300 Krad 2, 29 = สบู่ดำ 300 Krad 3, 30 = สบู่ดำสหรัฐ 8.45 Krad, 31 = สบู่ดำ
สหรัฐอเมริกา, 32 = สบู่ดำฮาวาย, 33 = สบู่ดำสุรินัม (Surinume), 34 = สบู่ดำอินเดีย 1, 35 = สบู่ดำ
อินเดีย 2, 36 = สบู่ดำอินเดีย 3 (Chennai), 37 = สบู่ดำอินเดีย 4, 38 = สบู่ดำอินเดีย 5 (ราชสถาน),
39 = สบู่ดำอินเดีย 6 (D1), 40 = สบู่ดำอินเดีย 7, 41 = สบู่ดำลาว, 42 = สบู่ดำศรีลังกา 1,
43 = สบู่ดำศรีลังกา 2, 44 = สบู่ดำจีน, 45 = สบู่ดำจีน (แอนนา), 46 = สบู่ดำเขมร, 47 = สบู่ดำพม่า 1,
48 = สบู่ดำ พม่า 2, 49 = สบู่ดำ อินโดนีเซีย, 50 = สบู่ดำ พืช-พิเศษ, 51 = สบู่ดำ สุขสันต์ 1,
52 = สบู่ดำ สุขสันต์ 2, 53 = สบู่ดำ สุขสันต์ 3, 54 = สบู่ดำ สุขสันต์ 4, 55 = สบู่ดำ สุขสันต์ 5,
56 = สบู่ดำสุขสันต์ 6, 117 = สบู่ดำวิชาญ-พืช 1, 118 = สบู่ดำสุขสันต์-พืช 1,
119 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 1, 120 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 3, 121 = สบู่ดำผลรี,
122 = สบู่ดำวิชาญ-พืช 2, 123 = สบู่ดำสุขสันต์-พืช 2, 124 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 2,
125 = สบู่ดำ สุขสันต์อุทอง 4, 126 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 5 และ 127 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 6]



ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบสีอื่นนอกจากการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (ATG),

กับสบูดำ 67 ตัวอย่าง (M = แถบสีอื่นเอามาตรฐาน)

[1 = สบูดำแอนนา 16, 2 = สบูดำแอนนา 20/1, 3 = สบูดำแอนนา 33/1, 4 = สบูดำแอนนา 34/8,
5 = สบูดำแอนนา 78/9, 6 = สบูดำแอนนา 80/3, 7 = สบูดำแอนนา 27/4, 8 = สบูดำนครราชสีมา 1,
9 = สบูดำแอนนา 18/3, 10 = สบูดำแอนนา 83/5, 11 = สบูดำแอนนา 69/1, 12 = สบูดำแอนนา 6/8,
13 = สบูดำ FF25B-14, 14 = สบูดำ FF20-Sbr-3, 15 = สบูดำ E-L-23, 16 = สบูดำจันทบุรี, 17 = สบูดำ
ด่านช้าง สุพรรณบุรี, 18 = สบูดำ 108-21-50, 19 = สบูดำ 101-32-115, 20 = สบูดำนครราชสีมา 2,
21 = สบูดำสตูล-อินเดีย, 22 = สบูดำ M 6 - F US/1, 23 = สบูดำ M 54 -F 26/1, 24 = สบูดำ JD,
25 = สบูดำมุกดาหาร 10 Krad, 26 = สบูดำสุขสันต์ 10 Krad, 27 = สบูดำ 300 Krad 1,
28 = สบูดำ 300 Krad 2, 29 = สบูดำ 300 Krad 3, 30 = สบูดำสหรัฐ 8.45 Krad, 31 = สบูดำ
สหรัฐอเมริกา, 32 = สบูดำฮาวาย, 33 = สบูดำสุรินัม (Surinume), 34 = สบูดำอินเดีย 1, 35 = สบูดำ
อินเดีย 2, 36 = สบูดำอินเดีย 3 (Chennai), 37 = สบูดำอินเดีย 4, 38 = สบูดำอินเดีย 5 (ราชทาน),
39 = สบูดำอินเดีย 6 (D1), 40 = สบูดำอินเดีย 7, 41 = สบูดำลาว, 42 = สบูดำศรีลังกา 1,
43 = สบูดำศรีลังกา 2, 44 = สบูดำจีน, 45 = สบูดำจีน (แอนนา), 46 = สบูดำเขมร, 47 = สบูดำพม่า 1,
48 = สบูดำ พม่า 2, 49 = สบูดำ อินโดนีเซีย, 50 = สบูดำ พิชัย-พิเศษ, 51 = สบูดำ สุขสันต์ 1,
52 = สบูดำ สุขสันต์ 2, 53 = สบูดำ สุขสันต์ 3, 54 = สบูดำ สุขสันต์ 4, 55 = สบูดำ สุขสันต์ 5,
56 = สบูดำสุขสันต์ 6, 117 = สบูดำวิชาญ-พิชัย 1, 118 = สบูดำสุขสันต์-พิชัย 1,
119 = สบูดำสุขสันต์อุทอง 1, 120 = สบูดำสุขสันต์อุทอง 3, 121 = สบูดำผลรี,
122 = สบูดำวิชาญ-พิชัย 2, 123 = สบูดำสุขสันต์-พิชัย 2, 124 = สบูดำสุขสันต์อุทอง 2,
125 = สบูดำ สุขสันต์อุทอง 4, 126 = สบูดำสุขสันต์อุทอง 5 และ 127 = สบูดำสุขสันต์อุทอง 6]



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างสบู่ดำ 67 ตัวอย่าง สร้างโดยอาศัยข้อมูลจาก

(A) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (B) เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

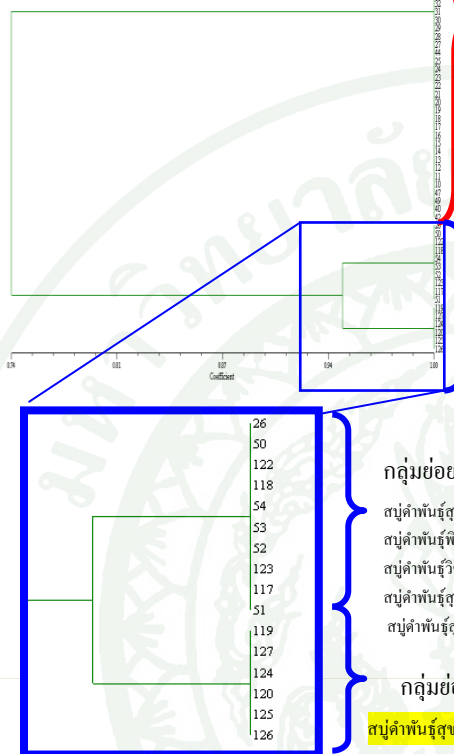
(C) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และไอเอสเอสอาร์ร่วมกัน

โดยใช้วิธี UPGMA ในโปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k

[1 = สบู่ดำแอนนา 16, 2 = สบู่ดำแอนนา 20/1, 3 = สบู่ดำแอนนา 33/1, 4 = สบู่ดำแอนนา 34/8,
5 = สบู่ดำแอนนา 78/9, 6 = สบู่ดำแอนนา 80/3, 7 = สบู่ดำแอนนา 27/4, 8 = สบู่ดำนครราชสีมา 1,
9 = สบู่ดำแอนนา 18/3, 10 = สบู่ดำแอนนา 83/5, 11 = สบู่ดำแอนนา 69/1, 12 = สบู่ดำแอนนา 6/8,
13 = สบู่ดำ FF25B-14, 14 = สบู่ดำ FF20-Sbr-3, 15 = สบู่ดำ E-L-23, 16 = สบู่ดำจันทบุรี, 17 = สบู่ดำ
ด่านช้าง สุพรรณบุรี, 18 = สบู่ดำ 108-21-50, 19 = สบู่ดำ 101-32-115, 20 = สบู่ดำนครราชสีมา 2,
21 = สบู่ดำสตูล-อินเดีย, 22 = สบู่ดำ M 6 - F US/1, 23 = สบู่ดำ M 54 -F 26/1, 24 = สบู่ดำ JD,
25 = สบู่ดำมุกดาหาร 10 Krad, 26 = สบู่ดำสุขสันต์ 10 Krad, 27 = สบู่ดำ 300 Krad 1,
28 = สบู่ดำ 300 Krad 2, 29 = สบู่ดำ 300 Krad 3, 30 = สบู่ดำสหรัฐ 8.45 Krad, 31 = สบู่ดำ
สหรัฐอเมริกา, 32 = สบู่ดำฮาวาย, 33 = สบู่ดำสุรินัม (Surinume), 34 = สบู่ดำอินเดีย 1, 35 = สบู่ดำ
อินเดีย 2, 36 = สบู่ดำอินเดีย 3 (Chennai), 37 = สบู่ดำอินเดีย 4, 38 = สบู่ดำอินเดีย 5 (ราชาน),
39 = สบู่ดำอินเดีย 6 (D1), 40 = สบู่ดำอินเดีย 7, 41 = สบู่ดำลาว, 42 = สบู่ดำศรีลังกา 1,
43 = สบู่ดำศรีลังกา 2, 44 = สบู่ดำจีน, 45 = สบู่ดำจีน (แอนนา), 46 = สบู่ดำแซมร, 47 = สบู่ดำพม่า 1,
48 = สบู่ดำ พม่า 2, 49 = สบู่ดำ อินโดนีเซีย, 50 = สบู่ดำ พืช-พิเศษ, 51 = สบู่ดำ สุขสันต์ 1,
52 = สบู่ดำ สุขสันต์ 2, 53 = สบู่ดำ สุขสันต์ 3, 54 = สบู่ดำ สุขสันต์ 4, 55 = สบู่ดำ สุขสันต์ 5,
56 = สบู่ดำสุขสันต์ 6, 117 = สบู่ดำวิชาญ-พืช 1, 118 = สบู่ดำสุขสันต์-พืช 1,
119 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 1, 120 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 3, 121 = สบู่ดำพลี,
122 = สบู่ดำวิชาญ-พืช 2, 123 = สบู่ดำสุขสันต์-พืช 2, 124 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 2,
125 = สบู่ดำ สุขสันต์อุทอง 4, 126 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 5 และ 127 = สบู่ดำสุขสันต์อุทอง 6]

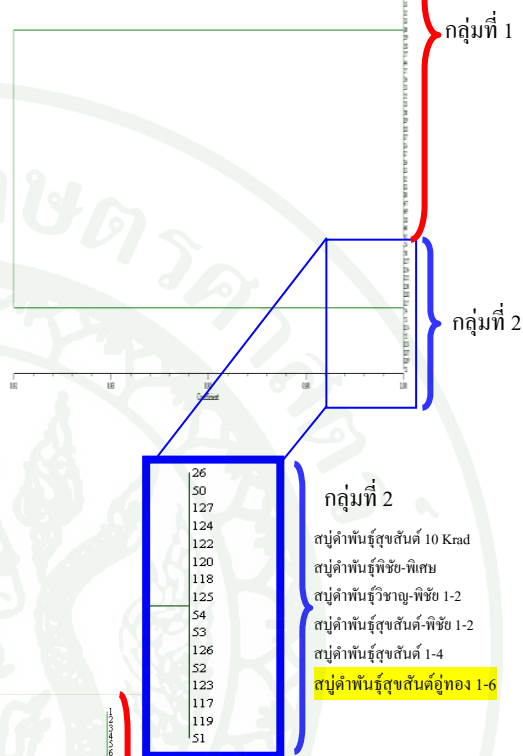
(A) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.72-1.00



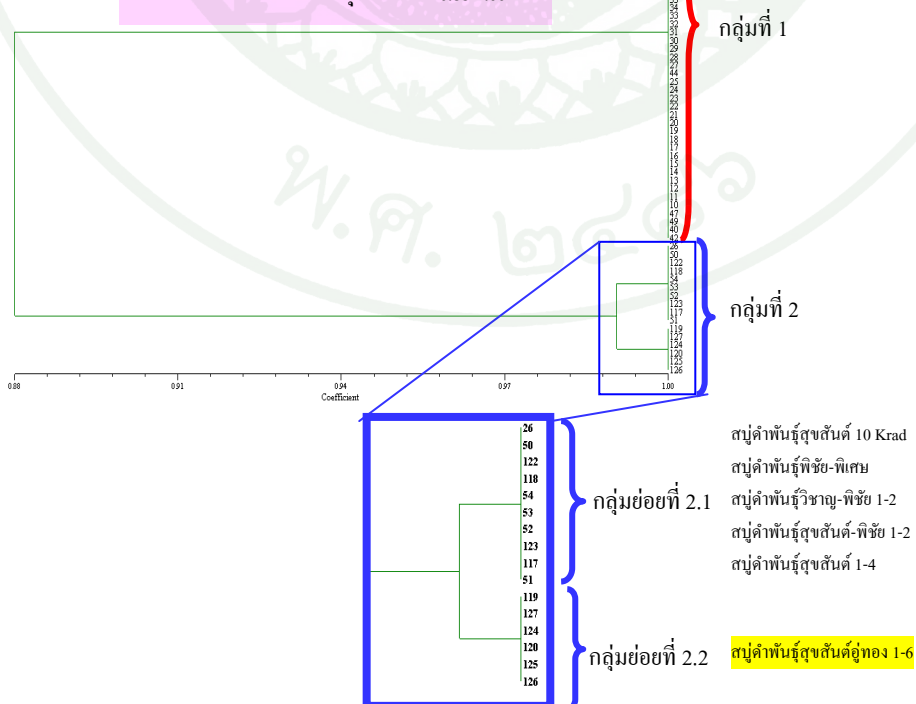
(B) เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.91-1.00



(C) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และไอเอสเอสอาร์

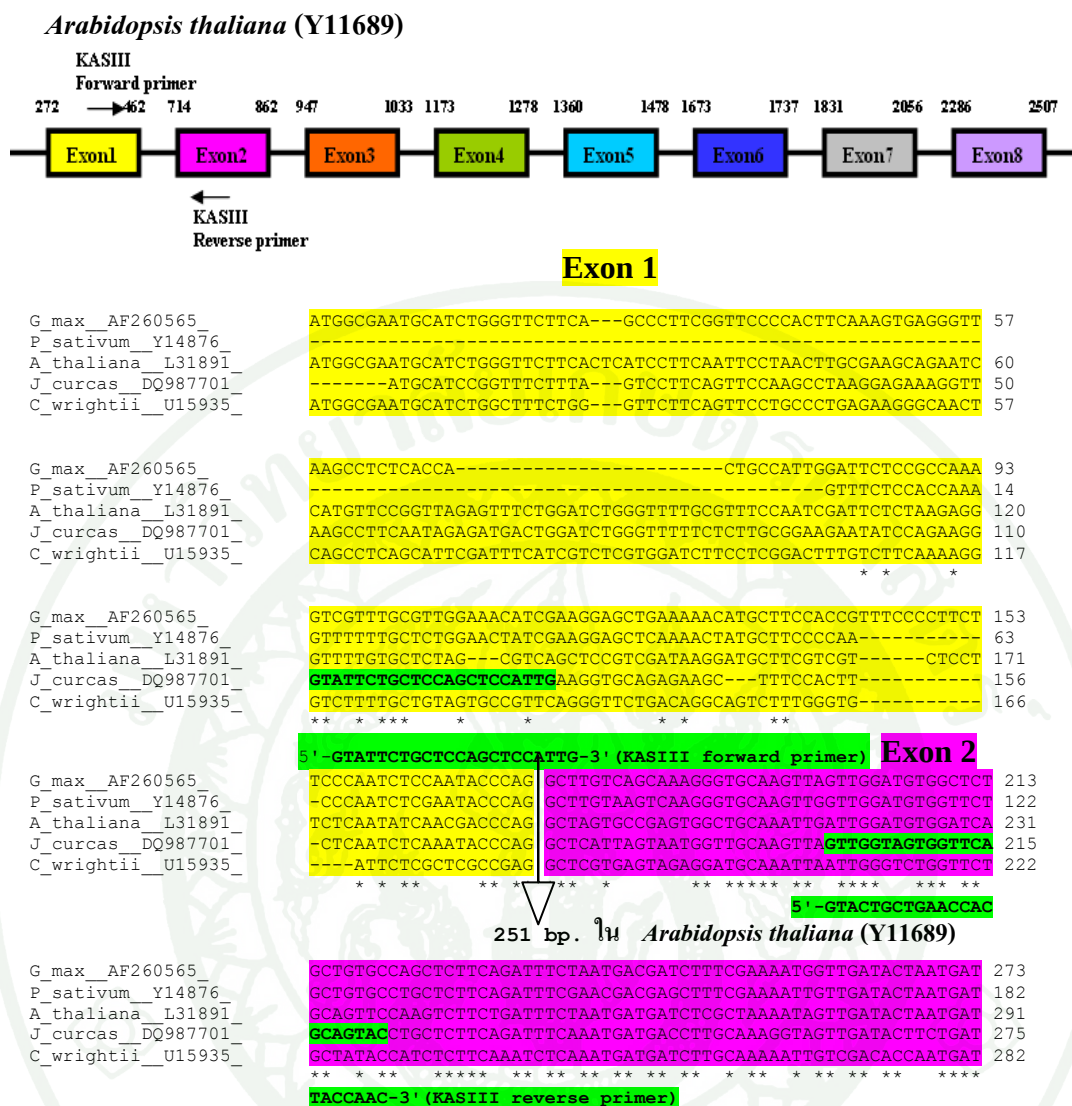
ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.88-1.00



4. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในสบู่ดำ

4.1 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *3-ketoacyl-ACP synthase III* (*KASIII*)

รวบรวมข้อมูลลำดับกรดอะมิโน และลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *KASIII* ที่สมบูรณ์ ในพืชจาก GenBank ทั้ง genomic DNA และ cDNA เพื่อนำมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ และใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *KASIII* โดยเลือกลำดับเบสยีน *KASIII* จาก genomic DNA จำนวน 1 accession จาก *Arabidopsis thaliana* (Y11689) ที่ประกอบด้วย 8 exons และ cDNA จำนวนทั้งหมด 5 accession คือ *Arabidopsis thaliana* (L31891), *Jatropha curcas* (DQ987701), *Cuphea wrightii* (U15935), *Glycine max* (AF260565) และ *Pisum sativum* (Y14876) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *KASIII* [forward primer (F): 5' GTATTCTGCTCCAGCTCCATTG 3' และ reverse primer (R): 5' GTACTGCTGAA CCACTACCAAC 3'] ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 1-intron 1-exon 2 มีขนาด intron เท่ากับ 251 คู่เบส ใน *A. thaliana* (Y11689) (ภาพที่ 11) แล้วนำผลผลิต PCR ที่จำเพาะกับยีน (AS-PCR) มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบนเจลอะกาโรส (เทคนิค DFLP) และ non-denaturing polyacrylamide gel (เทคนิค SSCP) ผลปรากฏว่า เทคนิค DFLP ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส ในสบู่ดำ 125 ตัวอย่าง โดยไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างทั้งหมด เช่นเดียวกับการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยเทคนิค SSCP อย่างไรก็ตาม พบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยว จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *KASIII* ในพืชที่อยู่ในสกุล *Jatropha* ได้แก่ สบู่ดำ (*Jatropha curcas*), สบู่แดง (*Jatropha gossypifolia*), เข็มปัตตาเวีย (*Jatropha integerrima*) และฝิ่นดิน (*Jatropha multifida*) แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในละหุ่ง (*Ricinus communis*) และ หนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica*) ความแตกต่างของแอลลีลที่พบในพืชสกุลเดียวกันนี้เป็นประโยชน์ในการตรวจสอบลูกผสมระหว่างพืชในสกุลเดียวกันในอนาคต (ภาพที่ 12 A-C)



ภาพที่ 11 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะ
กับยีน *KASIII* (Δ ตำแหน่งของ intron 1)

ภาพที่ 12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

จำเพาะสำหรับยีน *KASIII* ในสบู่ดำ (A) ด้วยเทคนิค DFLP (B) เทคนิค SSCP และ

(C) เทคนิค DFLP และ SSCP ในพืชสกุล *Jatropha* และละหุ่ง

[M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 1-127 = ตัวอย่างสบู่ดำตัวอย่างที่ 1-127 ตามตารางที่ 1,

Jc2 = สบู่ดำ แอนนา 20/1 (2), Jc5 = สบู่ดำ แอนนา 78/9 (5), Jc54 = สบู่ดำ สุขสันต์ 4

(54), Jm = ฝิ่นต้น (*Jatropha multifida*), Ji = เข็มปัตตาเวีย (*Jatropha integerrima*),

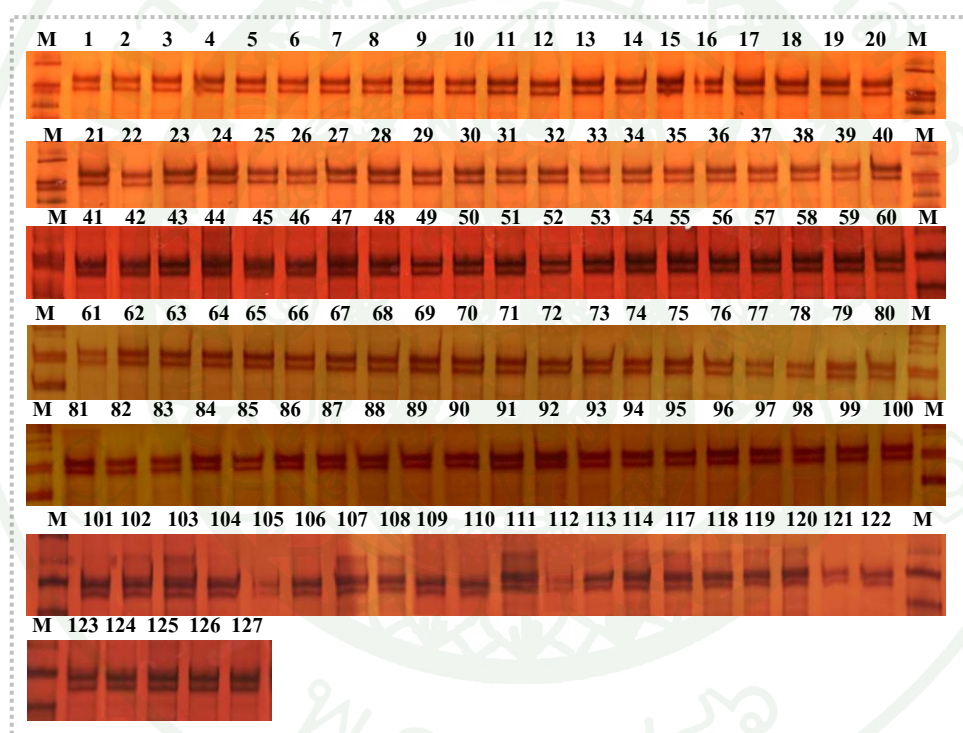
Jg = สบู่แดง (*Jatropha gossypifolia*), Jp = หนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica*)

และ Rc = ละหุ่ง (*Ricinus communis*)]

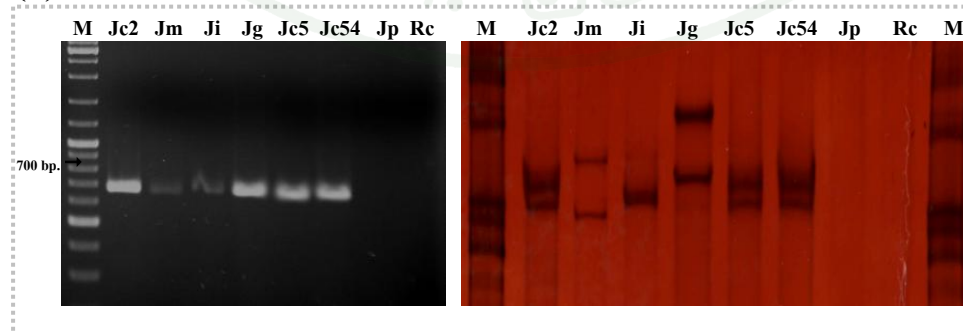
(A)



(B)



(C)



4.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *3-ketoacyl-ACP synthase II (KASII)*

รวบรวมข้อมูลลำดับกรดอะมิโน และลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ KASII ที่สมบูรณ์ ในพืชจาก GenBank ทั้ง genomic DNA และ cDNA เพื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ และใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *KASII* โดยเลือกลำดับเบสยีน *KASII* จาก genomic DNA จำนวน 1 accession จาก *Ricinus communis* (EF599102) ที่ประกอบด้วย 13 exons และ cDNA จำนวนทั้งหมด 2 accession คือ *Jatropha curcas* (DQ987700) และ *Ricinus communis* (XM002516182) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *KASII* [forward primer (F): 5' GCTTAGCGTTTGAGCCTTG TAG 3' และ reverse primer (R): 5' CAACACCCATTCCAGTGACAAC 3'] ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 1-intron 1-exon 2 มีขนาด intron เท่ากับ 467 คู่เบส ใน *R. communis* (EF599102) (ภาพที่ 13) แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบโดยเทคนิค DFLP และ SSCP พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 850 คู่เบสจากเทคนิค DFLP ในสัปดาห์ที่ 125 ตัวอย่าง และให้แถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวรูปแบบเดียวกันในตัวอย่างทั้งหมด จากการใช้เทคนิค SSCP อย่างไรก็ดีตาม พบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสด้วยเทคนิค DFLP และรูปแบบที่แตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยว จากเทคนิค SSCP โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *KASII* ในพืชที่อยู่ในสกุล *Jatropha* ดังนี้ สับปะรด (*J. curcas*), สับปะรด (*J. gossypifolia*), เข็มปัตตาเวีย (*J. integerrima*), ฝิ่นต้น (*J. multifida*) และละหุ่ง (*R. communis*) แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในหนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*) การออกแบบไพรเมอร์ในครั้งนี้ ใช้ลำดับเบสจาก genomic DNA และ cDNA ของละหุ่ง มาเปรียบเทียบกับสับปะรด และเลือกบริเวณที่คล้ายคลึงกัน มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และให้ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยว ในพืชวงศ์ Euphorbiaceae เช่น ละหุ่งได้ โดยความแตกต่างของแอลลีลที่พบในพืชสกุล *Jatropha* และละหุ่งนี้ เป็นประโยชน์ในการตรวจสอบลูกผสมระหว่างพืชในสกุลเดียวกัน และต่างสกุลในอนาคตได้ (ภาพที่ 14 A-C)

ภาพที่ 14 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

จำเพาะสำหรับยีน *KASII* ในสบู่ดำ (A) ด้วยเทคนิค DFLP (B) เทคนิค SSCP และ

(C) ด้วยเทคนิค DFLP และเทคนิค SSCP ในพืชสกุล *Jatropha* และละหุ่ง

[M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 1-127 = ตัวอย่างสบู่ดำตัวอย่างที่ 1-127 ตามตารางที่ 1,

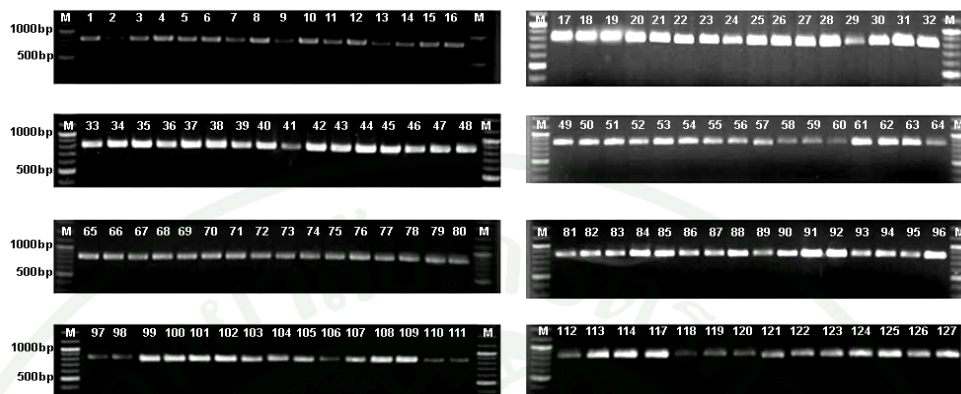
Jc2 = สบู่ดำ แอนนา 20/1 (2), Jc5 = สบู่ดำ แอนนา 78/9 (5), Jc54 = สบู่ดำ สุขสันต์ 4

(54), Jm = ฝิ่นต้น (*Jatropha multifida*), Ji = เข็มปัตตาเวีย (*Jatropha integerrima*),

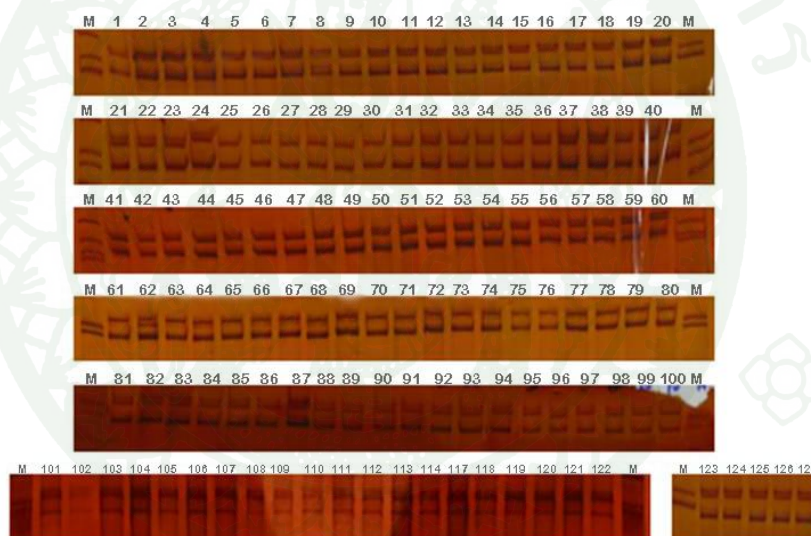
Jg = สบู่แดง (*Jatropha gossypifolia*), Jp = หนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica*),

และ Rc = ละหุ่ง (*Ricinus communis*)]

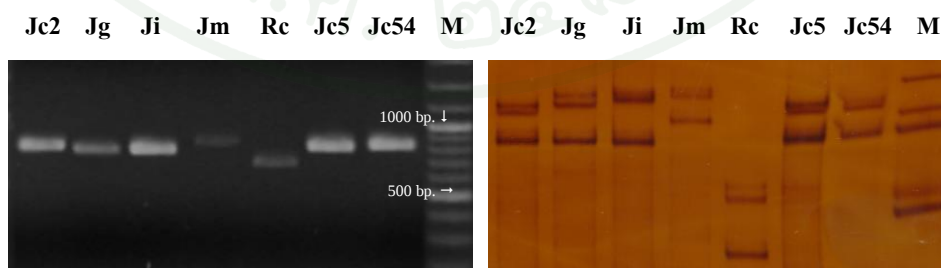
(A)



(B)

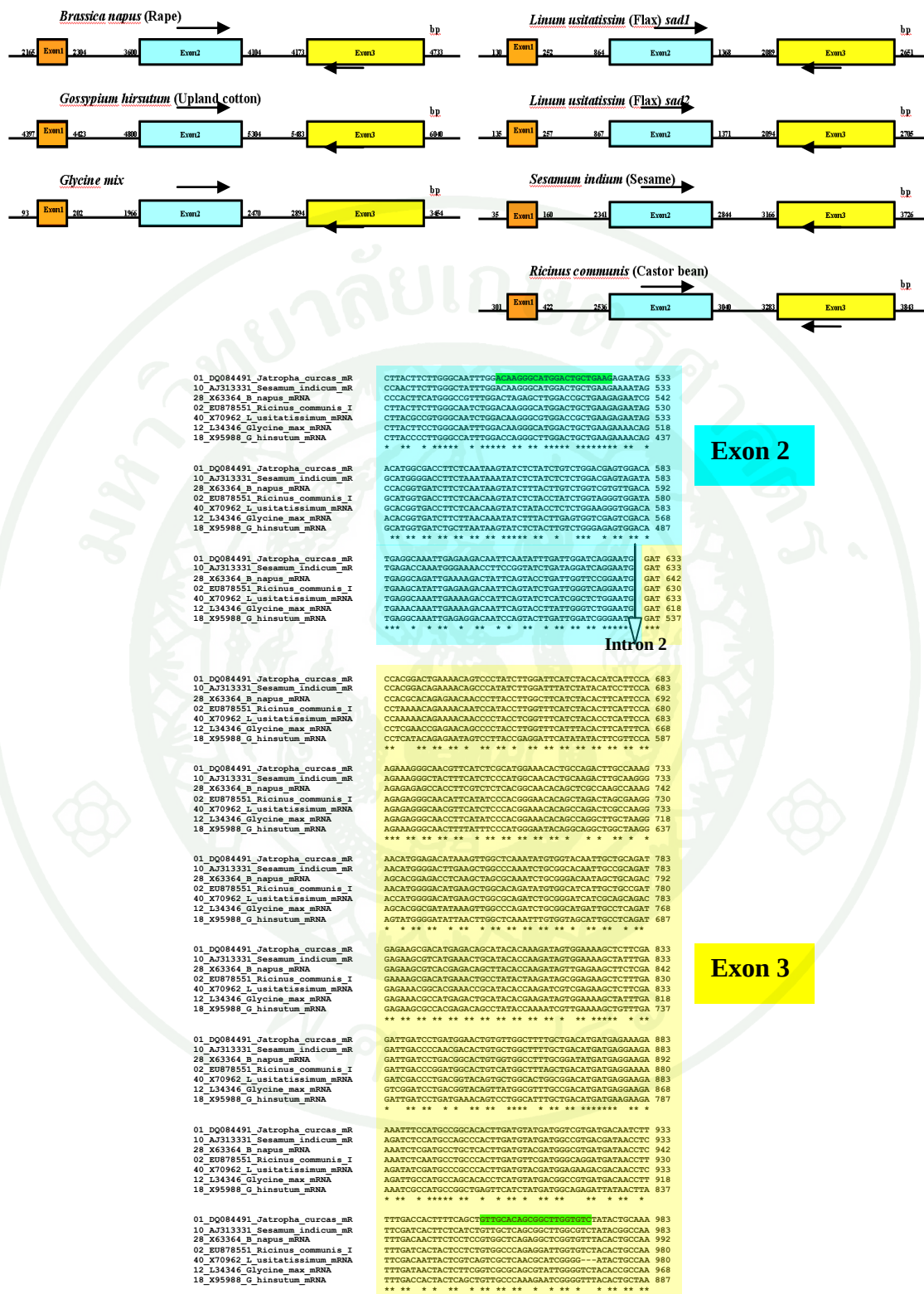


(C)



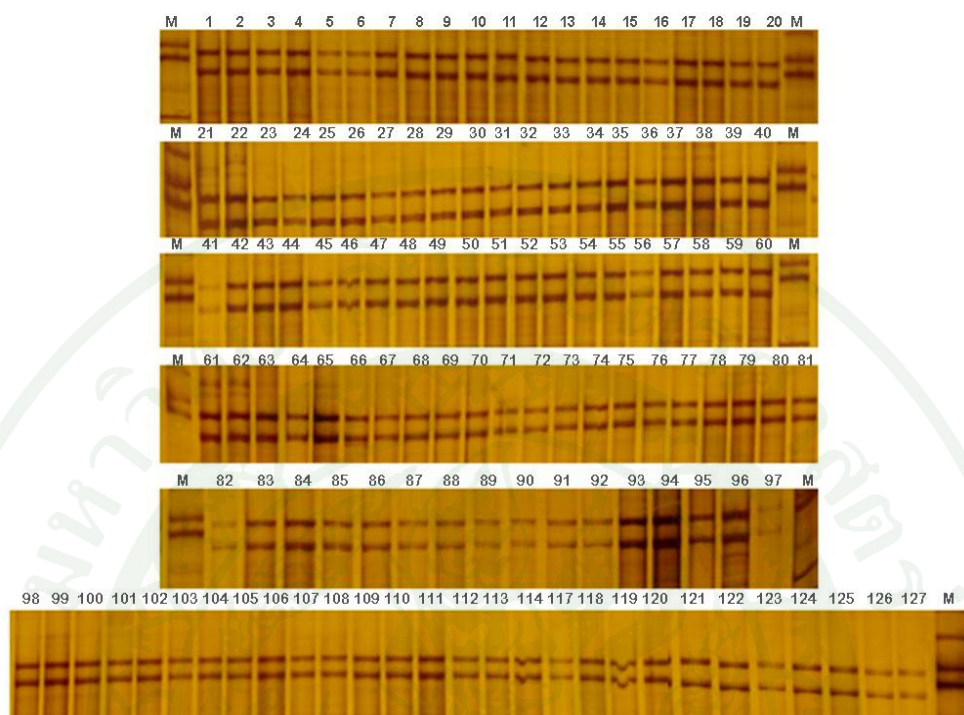
4.3 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *Stearoyl-ACP Desaturase (SAD)*

รวบรวมข้อมูลลำดับกรดอะมิโน และลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ SAD ที่สมบูรณ์ ในพืชจาก GenBank ทั้ง genomic DNA และ cDNA นำมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ และใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับยีน SAD เลือกลำดับเบสของยีน SAD จาก genomic DNA จำนวน 8 accession ที่ประกอบด้วย 3 exons ในพืชชนิดต่าง ๆ ดังนี้ *Ricinus communis* (EU878554), *Sesamum indicum* (D49832), *Glycine max* (AY885234), *Glycine max* (AY885233), *Gossypium hirsutum* (AJ132636), *Brassica napus* (X74782) และ *Linum usitatissimum* (AJ006957) (AJ006958) และ cDNA จำนวนทั้งหมด 10 accession ดังนี้ *Jatropha curcas* (DQ084491), *Ricinus communis* (EU878551 และ X56508), *Sesamum indicum* (AJ313331), *Glycine max* (L34346), *Gossypium hirsutum* (X95988), *Brassica rapa* (X60978), *Brassica napus* (AY642537 และ X63364) และ *Linum usitatissimum* (X70962) จากข้อมูลลำดับเบสของยีนที่สร้างเอนไซม์ SAD ของพืชใน GeneBank นำมาเปรียบเทียบ พบว่า มี 2 introns และ 3 exons โดย intron 2 มีขนาด ดังนี้ 242 คู่เบส ใน *R. communis* (EU878554), 321 คู่เบส ใน *S. indicum* (D49832), 423 คู่เบส ใน *G. max* (AY885234 และ AY885233), 178 คู่เบส ใน *G. hirsutum* (AJ132636), 68 คู่เบส ใน *B. napus* (X74782) และ 720 คู่เบส และ 65 คู่เบส ใน *L. usitatissimum* (AJ006957 และ AJ006958) (ภาพที่ 15) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะสำหรับยีน SAD [forward primer (F) คือ 5' ACAAGGGCATGGACTGCTGAAG 3' และ reverse primer (R) คือ 5' GACACCAAGCCGCTGTGCAAC 3'] ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 2-intron 2-exon 3 แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบโดยเทคนิค DFLP และ SSCP พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 คู่เบส และให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียวกันในสันท้าทั้ง 125 ตัวอย่าง ทั้งเทคนิค DFLP และ SSCP (ภาพที่ 16 A และ B) อย่างไรก็ตามพบความแตกต่างของขนาด และรูปแบบแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากทั้งสองเทคนิคในพืชสกุล *Jatropha* ได้แก่ สันท้า (*J. curcas*) และสันท้าแดง (*J. gossypifolia*) แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในเข็มปัตตาเวีย (*J. integerrima*), ฝิ่นต้น (*J. multifida*), หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*) และละหู่ (*R. communis*) ได้ (ภาพที่ 16 A และ B)

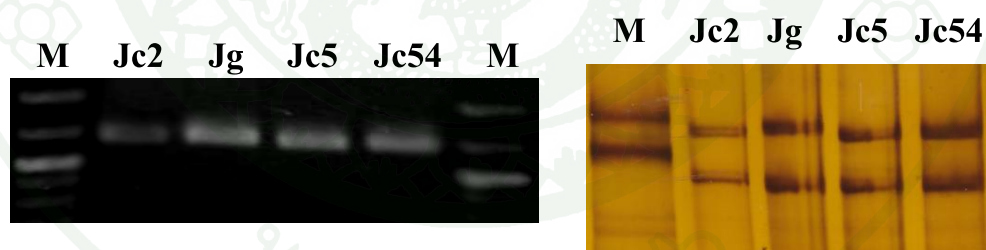


ภาพที่ 15 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *SAD* (Δ คือ ตำแหน่งของ intron 2)

(A)



(B)



ภาพที่ 16 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

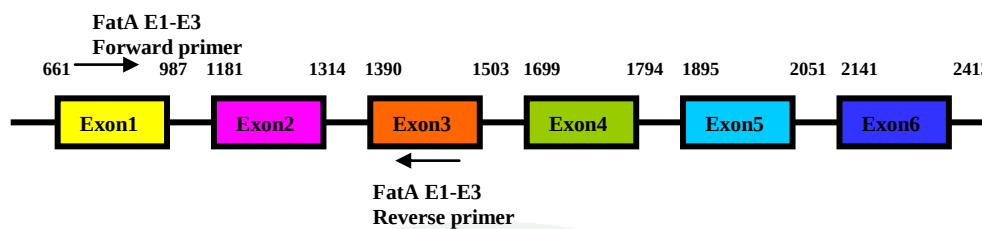
จำเพาะสำหรับยีน *SAD* ในสับดำ (A) ด้วยเทคนิค SSCP และ (B) ด้วยเทคนิค DFLP และเทคนิค SSCP ในพืชสกุล *Jatropha*

[M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 1-127 = ตัวอย่างสับดำตัวอย่างที่ 1-127 ตามตารางที่ 1, Jc2 = สับดำ แอนนา 20/1 (2), Jc5 = สับดำ แอนนา 78/9 (5), Jc54 = สับดำ สุขสันต์ 4 (54) และ Jg = สับแดง (*Jatropha gossypifolia*)]

4.4 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *Acyl-ACP Thioesterase (FatA)*

รวบรวมข้อมูลลำดับกรดอะมิโน และลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ FatA ที่สมบูรณ์ ในพืชจาก GenBank ทั้ง genomic DNA และ cDNA นำมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ และใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับยีน เลือกลำดับเบสของยีน *FatA* จาก genomic DNA จำนวน 1 accession ใน *Brassica napus* (X87842) ที่ประกอบด้วย 6 exons และ cDNA จำนวนทั้งหมด 3 accession ดังนี้ *Brassica napus* (X73849) และ (X73850) และ *Jatropha curcas* (EU267122) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *FatA* [forward primer (F): 5'-ACTGCTACCGTTGAGACTATCG-3' และ reverse primer (R): 5'-GAATCCAGTCACGTC TAGTTCC-3'] ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 1-intron 1-exon 2- intron 2- exon 3 โดย intron 1 และ 2 มีขนาดเท่ากับ 193 คู่เบส และ 75 คู่เบส ตามลำดับ ใน *B. napus* (X87842) (ภาพที่ 17) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบผล โดยเทคนิค DFLP และ SSCP ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1100 คู่เบส จากเทคนิค DFLP ในสับุดำทั้ง 125 ตัวอย่าง และให้แถบ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวรูปแบบเดียวกันในตัวอย่างสับุดำทั้งหมด จากการใช้เทคนิค SSCP อย่างไรก็ตาม พบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอจากทั้งเทคนิค DFLP และ SSCP ในพืชสกุล *Jatropha* ได้แก่ สับุดำ (*J. curcas*), สับูแดง (*J. gossypifolia*), เข็มปัตตาเวีย (*J. integerrima*) และฝิ่นต้น (*J. multifida*) แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในละหุ่ง (*R. communis*) และ หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*) ได้ (ภาพที่ 18 A-C)

Brassica napus (X87842)



B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

GGGATTAAACAAAACGCCACCGTCGAGACAATTGCTAATCTTCTACAG-- 495
GGGATTAAACAAAACGCCACCGTCGAGACAATTGCTAATCTTCTACAG 989
GGGATTAAACAAAACGCCACCGTCGAGACAATTGCTAATCTTCTACAG-- 495
GGGATTAAATAAACGCTACCGTCGAGACAATGCTAATTTTTTGCAG-- 333
***** **

B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

TGGAATCACATTTTTTTTTTCTAAGTTTTAGTGTATGCGTTTGGTGTGTAAA 1039

B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

CCATCTGGTGTGGTTATGTCTTGTATGTTAAACATATTGTTCTTAATGTGATC 1089

B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

TAAGTTTAGTGTATGCGTTTGTGTAAACCATCTGGTGTGGTTATGTCT 1139

B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

----- GAGGTGGCG 505
TTGATTTTAAATGTTAAGCATGAAAAATATATATATATATAG GAGGTGGCG 505
----- GAGGTGGCG 1189
----- GAGGTGGCA 1189
----- GAGGTGGCG 343
----- *****

B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

TGTAACCATGTTTCAAGAGTGGGATCTCGACGGATGGATTTGCCACAAC 554
TGTAAACATGTTTCAAGAGTGGGATCTCGACGGATGGATTTGCCACAAC 554
TGTAAACATGTTTCAAGAGTGGGATCTCGACGGATGGATTTGCCACAAC 1239
TGTAAATCATGCTCAGAGTGTGGATTTTCAACTGATGGATTTGCTACAC 1239
***** **

B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

ACTCACCATGAGGAATTGCATCTCATATGGGTCACTGCAAGAATGCGACA 604
ACTCACCATGAGGAATTGCATCTCATATGGGTCACTGCAAGAATGCGACA 1289
ACTCACCATGAGGAATTGCATCTCATATGGGTCACTGCAAGAATGCGACA 604
CCCACATGAGGAAGTCTGATCTCATATGGGTCACTGCAAGAATGCGACA 442
***** **

B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

TTGAGATCTACAAATATCCAGCTTG-- 629
TTGAGATCTACAAATATCCAGCTTG-- 1339
TTGAGATCTACAAATATCCAGCTTG-- 629
TTGAAATATAATAATACCTGCTGCT-- 467
***** **

B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

TGGAGGTGCGAGTTTGTAAACCTCAAAGCTTATTCTTACTTGGTTTAAC 1389

B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

GAGTGATGTTTGTGAGATGAGACATGGTGCAGAGTGAAGGAAGGATTG 680
GAGTGATGTTTGTGAGATGAGACATGGTGCAGAGTGAAGGAAGGATTG 1439
GAGTGATGTTTGTGAGATGAGACATGGTGCAGAGTGAAGGAAGGATTG 680
GAGTGATGTTTGTGAAATTAAGACATGGTGCAGAGTGAAGGAAGGATTG 518
***** **

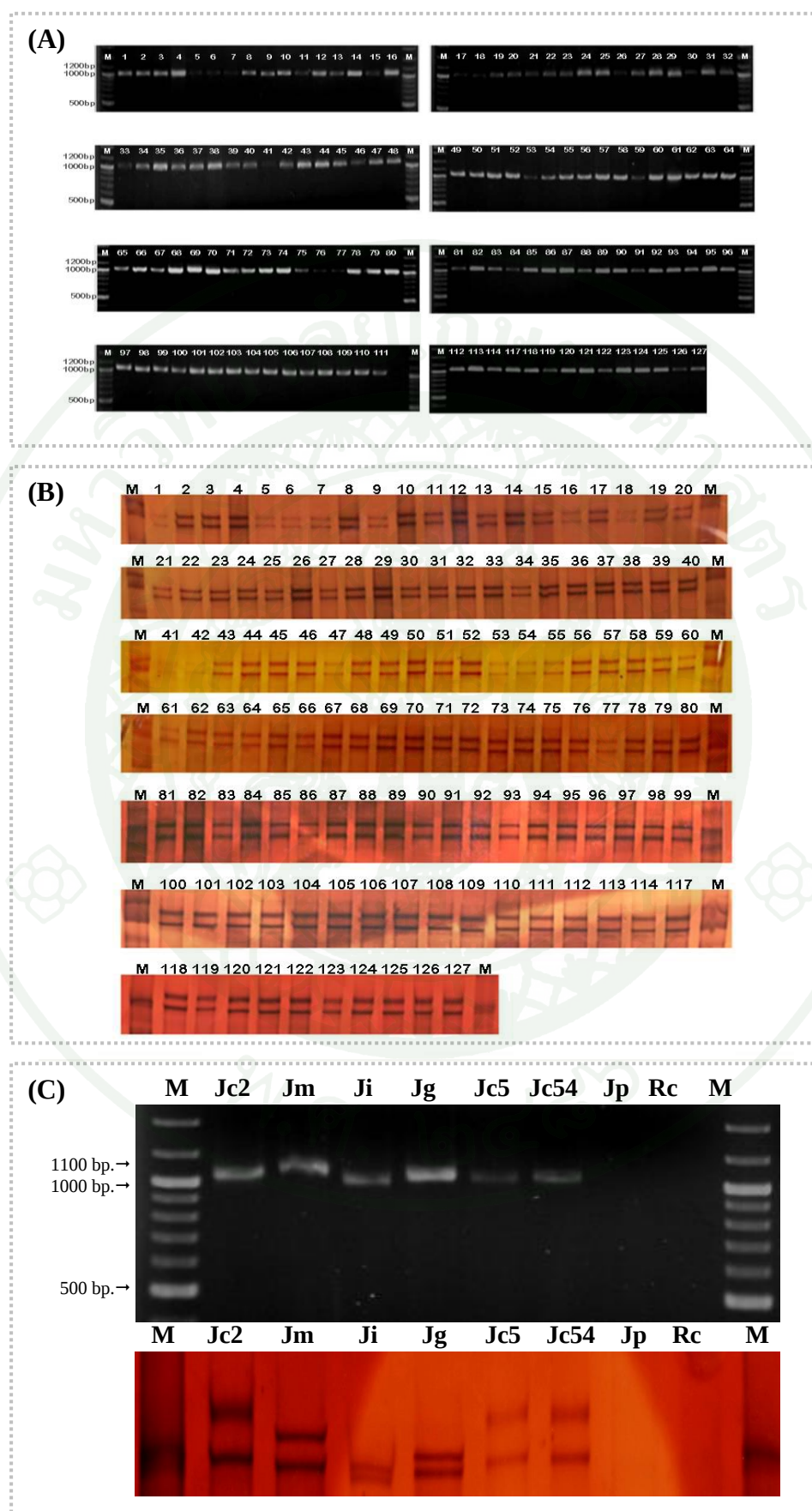
B.napus_pNL3_FatA mRNA
B.napus_FatA gDNA
B.napus_pNL2_FatA mRNA
J.curcas_FatA_mRNA

GAACGAGACGTGATTGATCTTAAGGAGCTCTGCTACAAATGAGGTTATT 749
GAACGAGACGTGATTGATCTTAAGGAGCTCTGCTACAAATGAGGTTATT 1289
GAACGAGACGTGATTGATCTTAAGGAGCTCTGCTACAAATGAGGTTATT 749
GAACGAGACGTGATTGATCTTAAGGAGCTCTGCTACAAATGAGGTTATT 529
***** **

ภาพที่ 17 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *FatA* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *B. napus* (X87842) และ cDNA ของสับปะรด และ *B. napus* ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 1-intron 1-exon 2-intron 2-exon 3

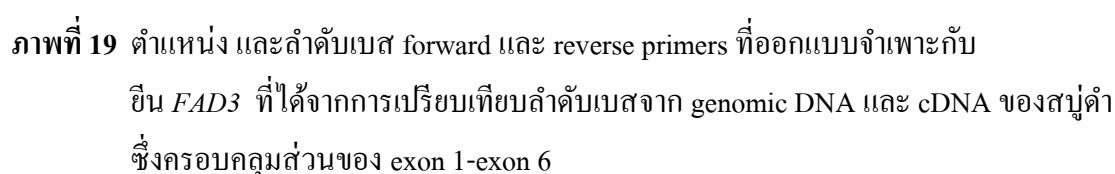
ภาพที่ 18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

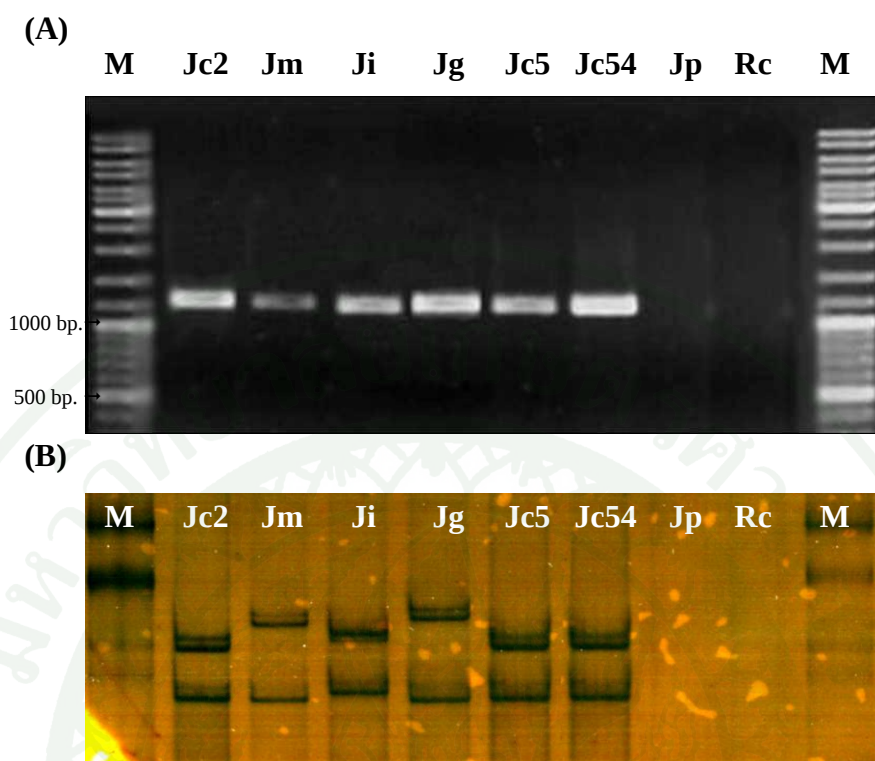
จำเพาะสำหรับยีน *FatA* (A) ด้วยเทคนิค DFLP ในสบู่ดำ (B) เทคนิค SSCP ในสบู่ดำ และ (C) ด้วยเทคนิค DFLP และ เทคนิค SSCP ในพืชสกุล *Jatropha* และละหุ่ง
 [M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 1-127 = ตัวอย่างสบู่ดำตัวอย่างที่ 1-127 ตามตารางที่ 1, Jc2 = สบู่ดำ แอนนา 20/1 (2), Jc5 = สบู่ดำ แอนนา 78/9 (5), Jc54 = สบู่ดำ สุขสันต์ 4 (54), Jm = ฝิ่นต้น (*Jatropha multifida*), Ji = เข็มปัตตาเวีย (*Jatropha integerrima*), Jg = สบู่แดง (*Jatropha gossypifolia*), Jp = หนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica*), และ Rc = ละหุ่ง (*Ricinus communis*)]



4.5 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *Omega-3 Fatty acid Desaturase (FAD3)*

รวบรวมลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *FAD3* ที่สมบูรณ์ ในสับุ้คำจาก GenBank ทั้ง genomic DNA และ cDNA เพื่อนำมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ และใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับยีน ใช้ลำดับเบสของยีน *FAD3* จาก genomic DNA ใน *Jatropha curcas* (DQ665869) ที่ประกอบด้วย 8 exons และ cDNA ใน *J. curcas* (DQ452089) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *FAD3* [forward primer (F): 5'-TGTTGTGA GAGATGTGGCTGTG-3' และ reverse primer (R): 5'- CGATACCAGGGAA GCTTATCC-3'] ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 1-exon 6 (ภาพที่ 19) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาตรวจสอบโดยเทคนิค DFLP และ SSCP ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1300 คู่เบส โดยไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ จากทั้งเทคนิค DFLP และ SSCP ในสับุ้คำ 125 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม พบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากการวิเคราะห์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *FAD3* ในพืชที่อยู่ในสกุล *Jatropha* ดังนี้ สับุ้คำ (*J. curcas*), ฝิ่นต้น (*J. multifida*), เข็มปัตตาเวีย (*J. integririma*) และสับุ้แดง (*J. gossypifolia*) แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในหนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) ได้ (ภาพที่ 20 A และ B)



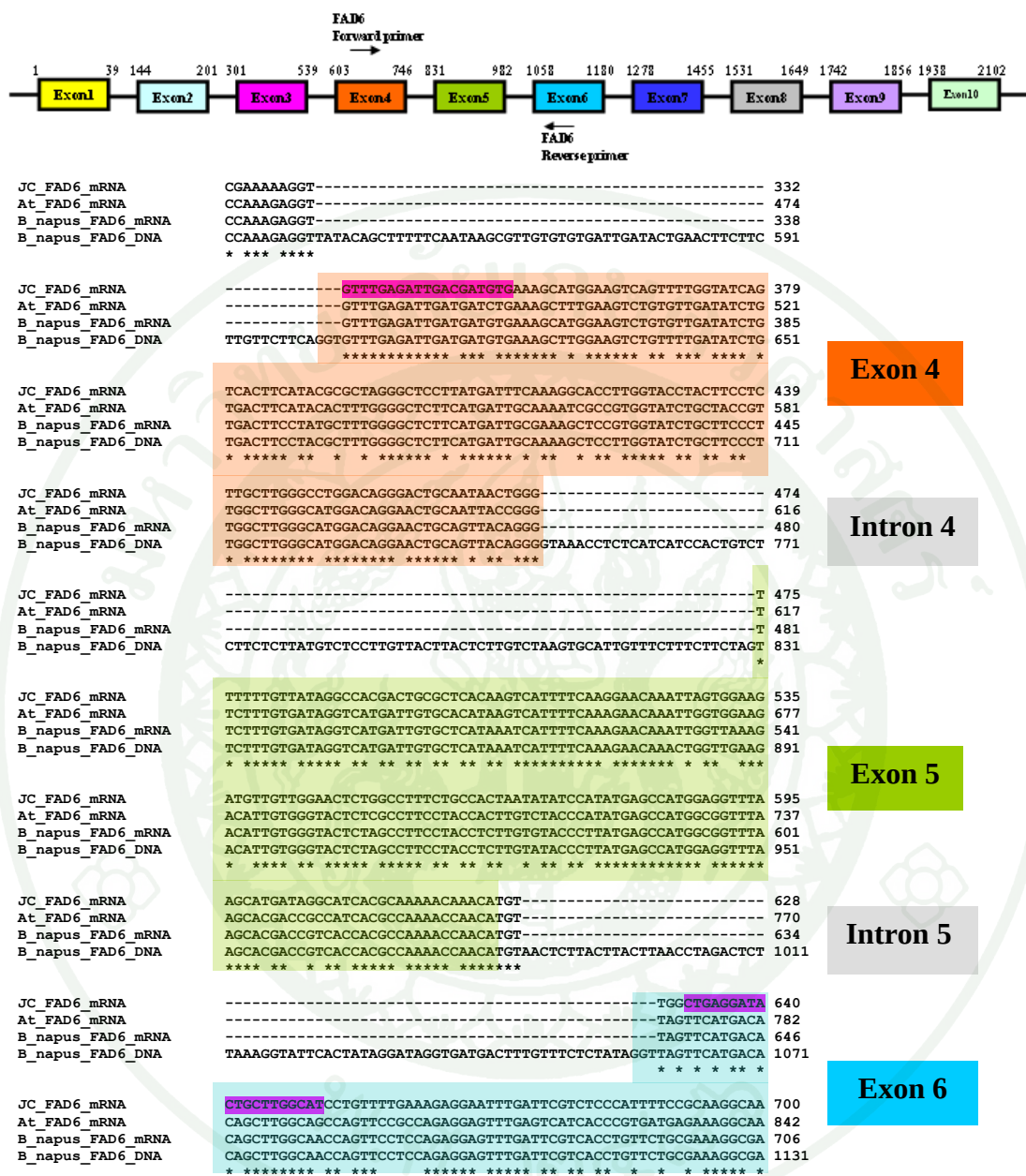


ภาพที่ 20 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะสำหรับยีน *FAD3* กับพืชในสกุล *Jatropha* และละหุ่ง (A) ด้วยเทคนิค DFLP และ (B) เทคนิค SSCP (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

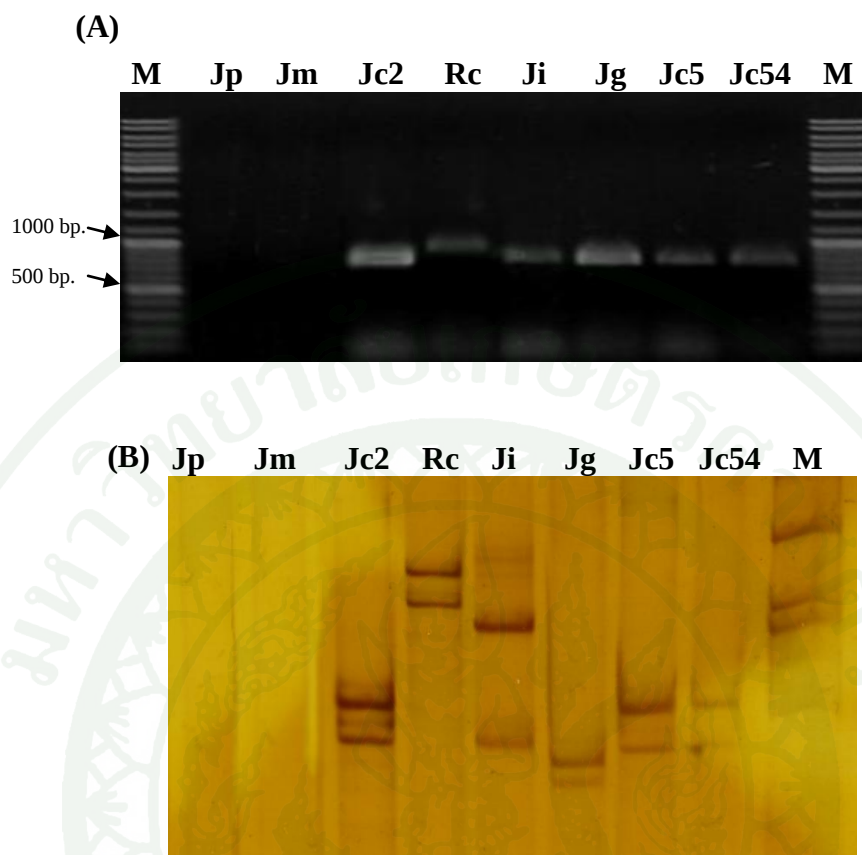
Jc2	=	สบู่ดำพันธุ์แอนนา 20/1 หมายเลข 2
Jc5	=	สบู่ดำพันธุ์แอนนา 78/9 หมายเลข 5
Jc54	=	สบู่ดำพันธุ์สุขสันต์ 4 (Maxico-non toxic) หมายเลข 54
Jm	=	ฝิ่นต้น (<i>Jatropha multifida</i> Linn.)
Ji	=	เข็มปัตตาเวีย (<i>Jatropha integerrima</i> Iacg.)
Jg	=	สบู่แดง หรือสบู่เลือด (<i>Jatropha gossypifolia</i> Linn.)
Jp	=	หนุมานนั่งแท่น (<i>Jatropha podagrica</i> Hook.)
Rc	=	ละหุ่ง (<i>Ricinus communis</i>)

4.6 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *Omega-6 Fatty acid Desaturase (FAD6)*

รวบรวมข้อมูลลำดับกรดอะมิโน และลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ FAD6 ที่สมบูรณ์ ในพืชจาก GenBank ทั้ง genomic DNA และ cDNA นำมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ และใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับยีน เลือกลำดับเบสของยีน FAD6 จาก genomic DNA จำนวน 1 accession ของ *Brassica napus* (AY642540) ที่ประกอบด้วย 10 exons และ cDNA จำนวนทั้งหมด 3 accession ได้แก่ *Arabidopsis thaliana* (NM 119243) *Brassica napus* (AY642535) และ *Jatropha curcas* (EU106889) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน FAD6 [forward primer (F): 5'-GTGTTTGAGATTGACGATGTG-3' และ reverse primer (R): 5'-ATGCCAAGCAGTATCCTCAG-3'] ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 4-intron 4-exon 5-intron 5-exon 6 โดย intron 4 และ 5 มีขนาด 84 และ 77 คู่เบส ตามลำดับ ใน *B.napus* (AY642540) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ภาพที่ 21) แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ (AS-PCR) ที่ได้ มาตรวจสอบโดยเทคนิค DFLP และ SSCP ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส โดยให้รูปแบบเดียวกันในแถบดีเอ็นเอทั้งจากเทคนิค DFLP และ SSCP อย่างไรก็ตาม พบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างพืชในสกุลเดียวกัน ได้แก่ สนุ่นดำ (*J. curcas*), เข็มปัตตาเวีย (*J. integerrima*) และ สนุ่นแดง (*J. gossypifolia*) และพืชวงศ์ Euphorbiaceae เช่น ละหุ่ง (*R. communis*) แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในหนูมานั่งแท่น (*J. podagrica*) และฝิ่นต้น (*J. multifida*) ได้ (ภาพที่ 22 A และ B)



ภาพที่ 21 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับ ยีน *FAD6* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *Arabidopsis thaliana* (Y11689) และ cDNA ของ *A. thaliana* (NM 119243), *Brassica napus* (AY642535) และ *Jatropha curcas* (EU106889) ซึ่งครอบคลุมส่วนของ exon 4- exon 6



ภาพที่ 22 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะสำหรับยีน *FAD6* กับพืชในสกุล *Jatropha* และละหุ่ง (A) ด้วยเทคนิค DFLP และ (B) เทคนิค SSCP (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

Jc2	=	สบู่ดำพันธุ์แอนนา 20/1 หมายเลข 2
Jc5	=	สบู่ดำพันธุ์แอนนา 78/9 หมายเลข 5
Jc54	=	สบู่ดำพันธุ์สุขสันต์ 4 (Maxico-non toxic) หมายเลข 54
Jm	=	ฝิ่นต้น (<i>Jatropha multifida</i> Linn.)
Ji	=	เข็มปัตตาเวีย (<i>Jatropha integerrima</i> Iacg.)
Jg	=	สบู่แดง หรือสบู่เลือด (<i>Jatropha gossypifolia</i> Linn.)
Jp	=	หนุมานนั่งแท่น (<i>Jatropha podagrica</i> Hook.)
Rc	=	ละหุ่ง (<i>Ricinus communis</i>)

รูปแบบที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในสบูดำ ด้วยเทคนิค SSCP ไม่พบความแตกต่างที่ใช้จำแนกพันธุ์สบูดำทั้งในประเทศ และต่างประเทศ จัดได้ว่า สบูดำมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก แม้ในส่วนที่เป็น intron ของยีนก็มีการอนุรักษ์ไว้ Slabaugh *et al.* (1997) เสนอเทคนิคการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบดีเอ็นเอสายเดี่ยว เพื่อให้สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้สูงขึ้น โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ให้มีขนาดเล็กลง ก่อนนำไปตรวจสอบใน non-denaturing polyacrylamide gel ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า Restriction endonuclease fingerprinting-SSCP (Ref-SSCP) อย่างไรก็ตาม สบูดำ จัดเป็นพืชที่มีฐานพันธุกรรมแคบมาก แม้การตรวจสอบพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ ก็ไม่พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์สบูดำในประเทศไทย และต่างประเทศได้ พบเพียงความแตกต่างระหว่างสบูดำพันธุ์ที่มีสารพิษ phorbol ester สูง และพันธุ์ที่มีสารพิษ phorbol ester ต่ำกว่ามาตรฐาน หรือ ไม่มีสารพิษเท่านั้น เป็นการยืนยันว่า สบูดำมีความหลากหลายทาง พันธุกรรมต่ำมาก เมื่อเทียบกับพืชอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะ กับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน สามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างของ พืชที่อยู่ในสกุล *Jatropha* และละหุ่งได้

การพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *KASIII*, *KASII*, *SAD*, *FatA*, *FAD3* และ *FAD6* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ในเข็มปัตตาเวีย และพบความแตกต่างของ รูปแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากการใช้เทคนิค SSCP แต่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *SAD* ให้รูปแบบที่ไม่ชัดเจน เนื่องจากแถบดีเอ็นเอมีขนาดใกล้เคียงกับสบูดำมาก สำหรับในสบูแดง สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนได้เกือบทั้งหมด และพบความ แตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากเทคนิค SSCP ยกเว้นยีน *SAD* ที่ไม่สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ ส่วนฝิ่นต้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *KASIII*, *KASII*, *SAD*, *FatA* และ *FAD3* ได้ และพบความแตกต่าง ของรูปแบบแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากเทคนิค SSCP สำหรับละหุ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *KASII* และ *FAD6* โดยพบความแตกต่างของรูปแบบ แถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากเทคนิค SSCP ได้ แต่ในหนุมานนั่งแท่นนั้น ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนทุกชนิดที่ออกแบบได้ (ตารางที่ 6)

ยีน *KASII* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และพบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากเทคนิค SSCP ในพืชสกุล *Jatropha* ทุกชนิดที่นำมาศึกษาได้ รวมทั้งพืชวงศ์ Euphorbiaceae เช่น ละหุ่ง ซึ่งจัดอยู่วงศ์เดียวกันกับสบู่ดำ ถือว่าเป็นไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งสอดคล้องกับ Slabaugh *et al.* (1997) และ Hongtrakul *et al.* (1998) ที่ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายใน *Cuphea* และทานตะวัน และใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะสำหรับยีนในการทำแผนที่ยีนของจีโนม *Cuphea* ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะสำหรับยีนที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่ สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ข้าวตรวจสอบลูกผสม และการเกิดการกลายในข้าว (Sato and Nishio, 2003) เพื่อระบุ candidate gene ที่มีผลต่อลักษณะที่ปรากฏ เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์ wild type และยังสามารถใช้จำแนกข้าวพันธุ์ป่า และพันธุ์ปลูกออกจากกันได้ (ธนพร, 2546; ไวกจน์, 2547)

ตารางที่ 6 การตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในพืชชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษา

ยีนที่จำเพาะกับการ สังเคราะห์กรดไขมัน	<i>KASIII</i>	<i>KASII</i>	<i>SAD</i>	<i>FatA</i>	<i>FAD3</i>	<i>FAD6</i>
พืชที่ใช้ในการศึกษา						
สบู่ดำ (<i>J. curcas</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
เข็มปัตตาเวีย (<i>J. integerrima</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
สบู่แดง (<i>J. gossypifolia</i>)	✓	✓	×	✓	✓	✓
ฝิ่นต้น (<i>J. multifida</i>)	✓	✓	×	✓	✓	×
หนุมานนั่งแท่น (<i>J. podagrica</i>)	×	×	×	×	×	×
ละหุ่ง (<i>R. communis</i>)	×	✓	×	×	×	✓

× ไพรเมอร์ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในพืชชนิดนั้น ๆ ได้

✓ ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในพืชชนิดนั้น ๆ ได้

พืชบางชนิดที่ศึกษาไม่สามารถใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้น ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ผื่นต้น และหนุมานนั่งแท่น (ตารางที่ 6) อาจเนื่องมาจากการพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนนั้น ๆ ใช้ลำดับเบสจาก genomic DNA และ cDNA ในพืชหลายชนิด แต่จะอิงลำดับเบสของ cDNA จากสับดูดำเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากไม่พบลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันของพืชในสกุล *Jatropha* ชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล ทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะกับสับดูดำ แต่ก็ยังสามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับพืชอื่น ๆ ที่มีเบสคู่สมส่วนใหญ่ และมีบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ที่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ แม้จะไม่มีประสิทธิภาพมากนัก ดังจะเห็นได้จาก ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีปริมาณน้อยกว่าสับดูดำ จึงควรต้องหาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์เพื่อเปรียบเทียบความจำเพาะกับยีนจากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 ชนิด คือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับดูดำ พบว่า สับดูดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 ชนิด ในการจำแนกตัวอย่างสับดูดำภายในประเทศ และต่างประเทศ ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์มีประสิทธิภาพสูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันมีประสิทธิภาพต่ำ โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้น สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างสับดูดำเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สับดูดำพันธุ์มีพิษ และไม่มีพิษ และยังสามารถจำแนกภายในสับดูดำพันธุ์ไม่มีพิษ ออกเป็น 2 กลุ่มย่อยได้ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์นั้น สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างสับดูดำเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สับดูดำพันธุ์มีพิษ และไม่มีพิษเท่านั้น แต่เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมส่วนของ intron นั้น ไม่ให้ความแตกต่างภายในตัวอย่างสับดูดำ อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่พัฒนาขึ้นนี้ แม้จะไม่สามารถระบุพันธุ์จำเพาะในสับดูดำได้ แต่ให้ความแตกต่างระหว่างพืชในสกุล *Jatropha* และพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เช่น ละหุ่ง ได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์การตรวจสอบลูกผสม ที่เกิดจากสับดูดำกับพืชต่างชนิดในสกุล *Jatropha* (interspecific hybridization) หรือ ต่างสกุล (intergeneric hybridization) ในอนาคตได้ ทั้งนี้สามารถนำไปสู่การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันของพืชในสกุล *Jatropha* และ ละหุ่ง เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน ในพืชกลุ่มนี้ต่อไป

สรุป

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากสับดูดำ 3 ตัวอย่าง คือ สับดูดำพันธุ์ FF20 Sbr3 (Sbr3), สหรัฐอเมริกา (USA) และนครราชสีมา 1 (NRM) ด้วยวิธี enrichment ร่วมกับเทคนิค dot blot hybridization โดยใช้ $(CA)_{15}$, $(GA)_{15}$, $(ACC)_{10}$ และ $(CCT)_{10}$ เป็นโพรบ เมื่อนำโคลนทั้งหมดที่ได้มาหาลำดับเบส พบว่า มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ 58 โคลน เป็นลำดับเบสซ้ำชนิด dinucleotide repeat มากที่สุด (37.93 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาเป็น trinucleotide repeat (24.14 เปอร์เซ็นต์) compound repeat (29.33 เปอร์เซ็นต์) และ imperfect repeat (8.60 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ที่พบมากที่สุด เป็น dinucleotide repeat ชนิด $(GA)_n$ คิดเป็น 32.76 เปอร์เซ็นต์ของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด โดยสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 38 คู่ คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ เป็นไปตามขนาดที่คาดหมายได้ 18 คู่ นำไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้น มาตรวจสอบกับสับดูดำทั้งหมด 125 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากในประเทศ และต่างประเทศ พบว่า คู่ไพรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียวในสับดูดำทุกตัวอย่าง ยกเว้นไพรเมอร์ 5 คู่ คือ JC Sbr3_37, JC USA_12, JC NRM_20, JC NMR_147 และ JC NRM_221 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยมีจำนวนแอลลีล 2 แอลลีล หรือ แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาดต่อตำแหน่ง หรือ ต่อคู่ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ JC USA_12, NRM_20, JC NMR_147 และ NRM_221 ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสับดูดำกลุ่มที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester สูง และสับดูดำกลุ่มที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester ได้

เมื่อวิเคราะห์ค่า PICs พบค่า PICs มีค่าอยู่ในช่วง 0.15-0.22 โดยมีค่า PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.21 เมื่อคำนวณค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ตามวิธีของ Nei and Li (1978) พบค่า ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity) ตั้งแต่ 0.72-1.00 และนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และสร้าง dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS- pc เวอร์ชัน 2.20k สามารถจำแนกสับดูดำ 125 ตัวอย่าง ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มแรก เป็นสับดูดำพันธุ์ที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester สูง จัดเป็นสับดูดำที่พบส่วนใหญ่ กลุ่มที่ 2 เป็นสับดูดำกลุ่มที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม โดยกลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย สับดูดำพันธุ์สุษสันต์ 10 Krad, สับดูดำพันธุ์พิชัย-พิเศษ, สับดูดำพันธุ์วิชาญ-พิชัย 1-2, สับดูดำพันธุ์สุษสันต์-พิชัย 1-2, สับดูดำพันธุ์สุษสันต์ 1-4 และกลุ่มย่อยที่ 2.2 คือ สับดูดำพันธุ์สุษสันต์ อุทอง 1-6

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในตัวอย่างสบู่ดำ 67 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมาย ไอเอสเอสอาร์ จากไพรเมอร์ 8 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 96 แถบ เฉลี่ย 12 แถบต่อชนิดของ ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสบู่ดำ จำนวน 16 แถบ และแถบ ดีเอ็นเอที่ไม่ให้ความแตกต่าง จำนวน 80 แถบ ไพรเมอร์ (AC)₈YG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 19 แถบ และไพรเมอร์ (CA)₈G ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 7 แถบ ขนาดดีเอ็นเอที่พบ อยู่ในช่วงประมาณ 0.3-2.5 กิโลเบส มีค่า PICs อยู่ในช่วง 0.00-0.36 เฉลี่ยเท่ากับ 0.06 เมื่อคำนวณ ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ตามวิธีของ Nei and Li (1978) พบค่าความคล้ายคลึงทาง พันธุกรรม มีค่า 0.91-1.00 โดยเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และสร้าง dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k สามารถจำแนกตัวอย่างที่ศึกษาได้ เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มสบู่ดำที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester สูง เป็นสบู่ดำพันธุ์ ที่พบส่วนใหญ่ และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มสบู่ดำที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสบู่ดำ โดยใช้เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์ และไอเอสเอสอาร์ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองชนิดสามารถจำแนก กลุ่มสบู่ดำ ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่เช่นกัน แต่เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไม่สามารถจำแนก ภายในสบู่ดำกลุ่มที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester ได้ ส่วนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์นั้น สามารถจำแนกสบู่ดำกลุ่มที่มีปริมาณสารพิษ phorbol ester ต่ำ หรือ ไม่มีสารพิษ phorbol ester ออกได้เป็นสองกลุ่มย่อย

เลือกข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำ จำนวน 67 ตัวอย่าง จากเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์ และไอเอสเอสอาร์ มาวิเคราะห์ร่วมกัน พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม อยู่ในช่วง 0.88-1.00 และการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k สามารถจำแนกสบู่ดำที่คัดเลือกไว้จำนวน 67 ตัวอย่าง ซึ่งมีรูปแบบ ความสัมพันธ์เหมือนกับที่ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันในสบู่ดำ 6 ยีน ได้แก่ ยีน *KASIII*, *KASII*, *SAD*, *FatA*, *FAD3* และ *FAD6* โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน ทั้ง 6 จากลำดับเบสของพืชชนิดต่าง ๆ ใน GenBank แต่อิงลำดับเบสจากสบู่ดำ โดยออกแบบ ไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณ intron เพื่อเพิ่มโอกาสที่จะพบความหลากหลายทางพันธุกรรม จากการตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DFLP และ SSCP

พบว่า ยังไม่สามารถจัดจำแนกพันธุ์สบู่ดำ หรือ จัดกลุ่มสบู่ดำในประเทศ และต่างประเทศออกจากกันได้ สรุปได้ว่า สบู่ดำมีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ในการจำแนกความหลากหลายในพืชที่อยู่ในสกุล *Jatropha* ได้แก่ เข็มปัตตาเวีย, สบู่แดง, ฝิ่นต้น และพืชในวงศ์เดียวกัน เช่น ละหุ่ง ได้ โดยเฉพาะเมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค SSCP สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบลูกผสมที่เกิดจากสบู่ดำกับพืชต่างชนิดในสกุล *Jatropha* (interspecific hybridization) หรือ ต่างสกุล (intergeneric hybridization) ได้ในอนาคต

ข้อมูลจากเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 ชนิด คือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ พบว่า สบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์มีประสิทธิภาพสูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน มีประสิทธิภาพต่ำ อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่พัฒนาขึ้นนั้น แม้จะไม่สามารถระบุพันธุ์จำเพาะในสบู่ดำได้ แต่ให้ความแตกต่างระหว่างพืชในสกุล *Jatropha* และพืชวงศ์ Euphorbiaceae สามารถนำไปใช้ประโยชน์การตรวจสอบลูกผสมที่เกิดจากสบู่ดำกับพืชต่างชนิดในสกุล *Jatropha* (interspecific hybridization) หรือ ต่างสกุล (intergeneric hybridization) ในอนาคตได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กระทรวงพาณิชย์. 2546. สินค้านำเข้าในประเทศไทย: ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าน้ำมันดิบในประเทศไทยรายปี. ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าสินค้าในประเทศไทยรายปี. แหล่งที่มา: <http://www.ops2.moc.go.th/tradeth/cgi/ImCountry2.asp>, 5 เมษายน 2553.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด, ปฐมา จาตุกานนท์, Laurent Vaysse และ สิริรัชกษณ์ เลียงประยูร. 2547. การศึกษาปริมาณและคุณภาพของน้ำมันสกัดจากสบู่ดำ, น.3-4. ใน รายงานฉบับสมบูรณ์เสนอ ศูนย์พัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีรัฐร่วมเอกชน. กรุงเทพฯ.
- จุลภาค คูนวงศ์. 2547. การพัฒนา Microsatellite marker เพื่อใช้ในการตรวจความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของลูกผสมพืชผักในวงศ์มะเขือและวงศ์แตง และใช้ในการปรับปรุงพันธุ์. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ชลที รอดสว่าง. 2546. การพัฒนา Marker สำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) และหญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชำนาญ นัตรแก้ว. 2549. สบู่ดำพืชพลังงาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์พินิจ, กรุงเทพฯ.
- ณัฏยา ศรีสวัสดิ์. 2545. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมะเขือเทศโดยการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธรรพร กลิ่นเกษร. 2546. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทวีศักดิ์ อุ่ณจิตติกุล. 2548. สบู่ดำ พืชพลังงานสารพัดประโยชน์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์วัชร, กรุงเทพฯ.

นันทวรรณ สโรบล. 2549. **สบู่ดำ**. สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งที่มา: <http://210.246.186.28/fieldcrops/phinut/index.HTM>, 23 ตุลาคม 2552.

นรินทร์ สมบูรณ์สาร. 2526. **ผลของฮอร์โมน IBA ต่อการเกิดรากในกิ่งปักชำสบู่ดำ**. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

นฤมล เข้มกลัดเงิน, โชคชัย เอกทัศนาวรรณ และวิภา หงส์ตระกูล. 2547. การพัฒนาเครื่องหมาย ดีเอ็นเอเพื่อการตรวจสอบการปลอมปนของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม, น. 134-135. ใน รายงานผลงานโครงการที่ได้รับทุน IRPUS ประจำปี 2547. กรุงเทพฯ.

ปรีชา ประเทพา และปิยวรา มีชัยโย. 2548. ลักษณะโมเลกุลของไมโครแซทเทลไลต์อาร์เอ็ม 17 ในพันธุ์ข้าวหอมและไม้อหอมของไทย, น. 378-392. ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ แห่งชาติ ครั้งที่ 14. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2537. **สบู่ดำ พลังงานทดแทนทางเลือกใหม่แห่งอนาคต**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์เพชรกระวี, กรุงเทพฯ.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. **สบู่ดำเพื่อไบโอดีเซล**. กรมพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, กรุงเทพฯ.

ไพจิตร จันทรวงศ์, วีรศักดิ์ อนันตบุตร, มาลี ประภาวัต, วิไล กาญจนภูมิ และอรวรรณ หวังศิธรรม. 2525. ผลการศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของสบู่ดำ. น. 1-10. ใน การใช้น้ำมันสบู่ดำ เติ้นเครื่องยนต์ดีเซล. กองเกษตรเคมี และกองวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

รยากร นกแก้ว, วิทยา ปันสุวรรณ และพิลาณี ไฉนอมสัจย์. 2550. การศึกษาความเป็นพิษและการลดพิษของน้ำมันสบู่ดำโดยการดูดซับ, น. 68-75. ใน การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รักษ์ พฤษชาติ. 2549. **สบู่ดำเพื่อทดแทนน้ำมันดีเซล**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ นีออน บุ๊ค มีเดีย, นนทบุรี.

ระพีพันธุ์ ภาสบุตร และ สุขสันต์ สิทธิผลไพบุลย์. 2525. ผลการวิจัยค้นคว้าการใช้น้ำมันสบู่ดำ เป็นพลังงานทดแทนในเครื่องยนต์ดีเซล, น. 11-14. ใน **การใช้น้ำมันสบู่ดำเดินเครื่องยนต์ดีเซล**. กองเกษตรเคมีและกองวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

โรงเรียนราชินีบูรณะ. 2548. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ**. ดีเอ็นเอ Fingerprinting. แหล่งที่มา: <http://www.rm.ac.th/ranee/genome.html>, 10 มิถุนายน 2552.

วิชัย บุญแสง อัญชลี ทัศนากจร ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ นุสรรา สิทธิคิดกรัตน์ และสกล พันธุ์ยิ้ม. 2541. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล**. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

วิฑูรย์ ใจผ่อง. 2551. **การศึกษารูปแบบวิธีการปลูกและระยะปลูกที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของสบู่ดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไวพจน์ กันจู. 2547. **การวิเคราะห์กรดไขมันและการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัลชลีย์ หุหลานนท์. 2527. **การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอกสบู่ดำและการติดผลของสบู่ดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริวรรณ บุรีคำ และรุ่งทิพย์ กาวิดา. 2550. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. ใน **นิทรรศการงานวิจัย บนเส้นทางงานวิจัย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร, วิภา หงษ์ตระกูล, นิศย์ศรี แสงเดือน, สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล, แอนนา สายมณีรัตน์, ประภา ศรีพิจิตต์, วิเชียร กิรตินิจกาล และเพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2550. การศึกษาสายพันธุ์เอ็นเอในสับดูดาโดยเทคนิคเอฟแอลพี ใน โครงการสัมมนา เรื่อง การประชุมวิชาการสับดูดาแห่งชาติครั้งที่ 1. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมบัติ ชินะวงศ์. 2549. สับดูดา การปลูกและการสร้างมูลค่าเพิ่มจากผลพลอยได้. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรมกำแพงแสน, นครปฐม

สุดาวัลย์ ศรีไพโรจน์. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรมอร์ในปลากัด, *Betta*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรพงษ์ เจริญรัต. 2549. ผลผลิตและต้นทุนการผลิตสับดูดา. จดหมายข่าว ผลิตใบ ก้าวใหม่การวิจัย และพัฒนาการเกษตร. 9: 2-4.

สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดี และเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนุวัฒน์ จันทรสวรรณ. 2548. การปลูกสับดูดา...ไม่ยากอย่างที่คิด. จดหมายข่าวผลิตใบ 8 (10): 12-13.

อรรถน มงคลพร. 2543. การสร้าง *microsatellite marker* สำหรับพริก. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ ศรีสอาด. 2549. สับดูดา. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์นาคา อินเตอร์มีเดีย, กรุงเทพฯ.

Achten, W. M. J., L. Verchot, Y. J. Franken, E. Mathijs, V. P. Singh, R. Aerts and B. Muys. 2008. *Jatropha* biodiesel production and use. **Biomass and Bioenergy** 32: 1063-1084.

- Adolf, W., H. J. Opferkuch and E. Hecker, 1984. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry** 23: 129-132.
- Alghanim, H. J. and J. R. Almirall. 2003. Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. **Anal. Bioanal. Chem.** 376 : 1225–1233.
- Akbar, E., Z.Yaakob and S.K. Kamarudin. 2009. Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock. **Eur. J. of Sci. Res.** 29: 396-403.
- Areshchenkova, T. and M.W. Ganai. 2002. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. **Theor. Appl. Genet.** 104: 229-235.
- Ashkenazi, V., E. Chani, U. Lavi, D. Levy, J. Hillel and R. E. Veilleux. 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. **Genome** 44: 50-62.
- Ashworth, V.E.T.M., M.C. Kobayashi, M. D. L. Cruz and M. T. Clegg. 2004. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. **Sci. Hort.** 101: 255–267.
- Banerji, R., A.R. Chowdhury, G. Misra, G. Sudarsanam, S.C. Verma and G.S. Srivastava. 1985. *Jatropha* seed oils for energy. **Biomass** 8: 277-282.7
- 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.

- Billotte, N., A.M. Risterucci, E. Barcelos, J.L. Noyer, P. Amblard and F.C. Baurens. 2001. Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elacis guineensis Jacques*) microsatellite markers. **Genome** 44:413-425.
- Biotech. 2005. **Automated DNA Sequencing**. Bioservice unit, Available source; http://bsu.biotec.or.th/sequeneing_overview.php, March 3, 2008.
- Bull, L. N., C. R. Pabón-Peña and N. B. Freimer. 1999. Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. **Genome** 9: 830-838.
- Caetano-Anolles, G. 1997. Resolving DNA amplification products using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, pp. 119-134. *In* R.M. Micheli and R. Bova, (eds.) **Fingerprinting Methods base on PCR**. Springer-Verlag, Heidelberg
- Chagué, V., T. Fahima, A. Dahan, G.L. Sun, A.B. Korol, Y.I. Ronin, A. Grama, M.S. Röder, and E. Nevo. 1999. Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the Yr15 gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. **Genome** 42: 1050-1056.
- Chambers, G. K. and E.S. MacAvoy. 2003. Microsatellite: consensus and controversy. **Comp. Biochem. Physiol.** 126: 455-476.
- Che, K.P., Q.C. Zhan, Q.H. Xing, Z.P. Wang, D.M. Jin, D.J. He and B. Wang. 2003. Tagging and mapping of rice sheath blight resistant gene. **Theor. Appl. Genet.** 106: 293-297.
- Chhabra, S.C., L.A. Mahunnah and E.N. Mshiu, 1990. Plants used in traditional medicine in eastern Tanzania. III. Angiosperms (Euphorbiaceae to Menispermaceae). **J. Ethnopharmacol** 28: 255-283.
- Chiba, N., K. Suwabe, T. Nunome and M. Hirai. 2003. Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major cucurbit crops. **Genome** 47: 1091-1104.

- Clarke, J. B. and K. R. Tobutt. 2006. Development of microsatellite primers and two multiplex polymerase chain reactions for the common elder (*Sambucus nigra*). **Mol. Ecol.** 6: 453-455.
- Collevatti, R. G., R. V. Brondani and D. Grattapaglia. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity** 83: 748-756.
- Dehgan, B. and G. L. Webster. 1979. **Morphology and Intrageneric relationships of the Genus *Jatropha* (Euphorbiaceae) Vol. 74.** University of California Publications in Botany, California.
- Diallo, N. 1994. Trees and hedges in the agricultural systems in Faranah prefecture. **Flamboyant** 31: 24-29.
- Dirle, W. E., P. Cosson, M. Tavaud, M. J. Aranzana, C. Poizat, A. Zanetto, P. Arús and F. Laigret. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theor. Appl. Genet.** 105:127-138.
- Divakara, B.N., H.D. Upadhyaya, S.P. Wani and C.L. Laxmipathi Gowda. 2010. **Biology and Genetic Improvement of *Jatropha curcas* L. A Review.** **Applied Energy** Available source; www.elsevier.com/locate/apenergy. March 20, 2010.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.
- Duke, J.A. 1985. **CRC Handbook of Medicinal Herbs.** CRC Press Inc, Boca Raton.
- Echt, C. S. and P. May-Marquardt 1997. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome** 40: 9-17.

Edwards, K.J., J.H.A. Barker, A. Daly, C. Janes and A. Karp. 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. **Biotechnology** 20:758-760.

Euphorbia international. 2008. **Euphorbia.**, Available source; www.euphorbia-international.org, March 3, 2008.

Fahima, T., M.S. Röder, A. Grama and E. Nevo. 1998. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust. **Theor. Appl. Genet.** 96: 187-195.

Gaitán-Solís, E., M.C. Daque, K.J. Edwards and J. Tohme. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* spp. **Crop Sci.** 42: 2128-2136.

Genger, R.K., K.J. Williams, H. Raman, B.J. Read, H. Wallwork, J.J. Burdon and A.H.D. Brown. 2003. Leaf scald resistance genes in *Hordeum vulgare* and *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*: parallels between cultivated and wild barley. **Aus. J. Agr. Res.** 54: 1335-1342.

Gimenes, M. A., A. Hoshino, A. V. Barbosa, D. A. Palmieri and C. R. Lopes. 2007. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biol.** 7(9):148-160.

Goldstein, D. B. and C. Schölterer. 1999. **Microsatellites Evolution and Application.** 1st ed. Oxford University Press, Great Britain.

Gübitz, G.M., M. Mittelbach, and M. Trabi. 1997. **Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas*.** Developed from the Symposium *Jatropha* Managua, Nicaragua February 23-27, 1997.

_____, 1998. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Biores. Tech. bol.** J. 67 : 73-82.

Gupta, P.K. and R.K. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica** 113: 163-185.

Gupta, P.K., H.S. Balyan, K.J. Edwards, P. Isaac, V. Korzum, M. Röder, M.F. Gautier, P. Joudrier, A.R. Schlatter, S. Dubcovsky, R.C. De la Pena, M. Khairallah, G. Penner, M.J. Hayden, P. Sharp, B. Keller, R.C.C. Wang, J.P. Hardouin and P. Leroy. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. **Theor. Appl. Genet.** 105: 413-422.

Gupta, S., M.Srivastava, G. P. Mishra, P.K. Naik, R.S. Chauhan, S.K. Tiwari, M. Kumar and R. Singh. 2008. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. **Afr. J. Biotechnol.** 23: 4230-4243.

Hadonou, A.M., D.J. Sargent, F. Wilson, C.M. James, and D.W. Simpson. 2004. Development of microsatellite markers in *Fragaria*, their use in genetic diversity analysis, and their potential for genetic linkage mapping. **Genome** 47: 429-438.

Hamilton, M.B., E.L. Pincus, A. Di-Fiore and R.C. Fleischer. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques** 27: 500-507.

Haas, W., H. Sterk, and M. Mittelbuch. 2002. Novel 12-Deoxy-16-hydroxy phorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. **J. Nat. Prod.** 65: 1434-1440.

- Hawkings, D.J. and J.C. Kridll. 1998. Characterization of acyl-ACP thioesterase of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola. **Plant J.** 13: 743-752.
- He, G., R. Meng, M. Newman, G. Gao, R.N. Pittman and C.S. Prakash. 2003. Microsatellite as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Plant Biol.** 3(3): 1-6.
- Heller, J. 1996. **Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. 1.** Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Research Institute, Rome.
- Hernandez, A. C. 1978. **Estudio de *Jatropha curcas* L. como recurso biotico.** Diploma thesis. University Veracruz, Yalapa-Insiquez, Veracruz, Mexico.
- Hicks, M., D. Adams, S. O. Keefe, E. Macdonald and R. Hodgetts. 1998. The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. latifolia). **Genome** 41: 797-805.
- Hongtrakul, V., M.B. Slabaugh, and S.J. Knapp. 1998. DFLP, SSCP, and SSR markers for 9-stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of unflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines. **Mol. Breed.** 4:195-203.
- Hossain, K. G., H. Kawai, M. Hayashi, M. Hoshi, N. Yamanaka, and K. Harada. 2000. Characterization and identification of (CT)_n microsatellites in soybean using sheared genomic libraries. **DNA Res.** 7: 103-110.
- Kadirvel, P., M. Maheswaran and K. Gunathilagaraj. 2003. Detection of simple sequence repeat markers associated with resistance to whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera* (Horvath), in rice. **Plant Breed.** 28: 22-23.

- Kobilke, H. 1989. **Untersuchungen zur Bestandesbegründung von Purgiernub (*Jatropha curcas* L.)**. Diploma Thesis. University Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Korzun, V., M.S. Röder, A.J. Warland and A. Börner. 1997. Intrachromosomal mapping of the genes for *dwarfing* (*Rht12*) and *vernalisation response* (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. **Plant Breed.** 116: 227-232.
- Kumar, L.S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. **Biotechnol. Adv.** 17: 143-182.
- Lagercrantz, U., H. Ellegren and L. Andersson. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucl. Acid Res.** 21: 1111-1115.
- Lele, S. 2005. **The Cultivation of *Jatropha curcas***. Available source; http://www.svlele.com/jatropha_plant.htm, January 10 2552.
- Levinson, G. and G.A. Gutman. 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. **Nucl. Acids Res.** 15: 5323-5338.
- Li, F., G. Hu, Y. Fu, H. Si, X. Bai and Z. Sun. 2005. Genetic analysis and high-resolution mapping of a premature senescence gene *Pse(t)* in rice (*Oryza sativa* L.). **Genome** 48: 738-746.
- Liu, S.Y., F. Sporer, M. Wink, J. Jourdane, R. Henning, Y.L. Li and A. Ruppel. 1997. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*. **Trop. Med. Int. Health** 2: 179-188.

- Morgante, M., M. Hanafer and W. Powell. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nat. Genet.** 30: 194-200.
- Morgante, M. and A.M. Oliveiri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant J.** 3: 175-182.
- Mariettea, S., D. Chagné, S. Decroocq, G. Giovanni, C. Lalannea, D. Madur and C. Plomion. 2001. Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. **Ann. For. Sci.** 58: 203–206.
- Makkar, H. P.S., G. Francis and K. Becker. 2008. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. **J. Sci. Food Agri.** 88: 1542-1548.
- Matos, M., M.V. Camacho, V. Pérez-Flores, B. Pernaute, O. Pinto-Carnide and C. Benito. 2005. A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. **Theor. Appl. Genet.** 111: 360-369.
- Martínez-Herrera J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Da'vila-Ortiz and K. Becke. 2005. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food Chem.** 96: 80–89.
- Mekhedov, S., O.M. de Ila Rduya and J. Ohlrogge. 2000. Toward a functional catalog of the plant genome: a survey of gene for lipid biosynthesis. **Plant Physiol.** 122: 389-401.
- Mengual, L. 1997. Extraction of bioactive substances from *J. curcas* and bioassays on *Zonocerus variegatus*, *Sesamia calamistis* and *Busseola fusca* for characterization of insecticidal properties. pp. 211-215. In: Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas*. G.M. Giibitz, M. Mittelbach, M. Trabi, (Eds.), DBV. Graz.

- Miller, C.A., A. Altinkut and N.L.V. Lapitan. 2001. A microsatellite marker for tagging *Dn2*, a wheat gene conferring resistance to the Russian wheat aphid. **Crop Sci.** 41: 1584-1589.
- Novelli, V. M., M. Cristofani, A. Souza and M. A. Machado. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genet. Mol. Biol.** 29: 90-96.
- Obert, D.E., A.K. Fritz and J.L. Moran. 2005. Identification and molecular tagging of a gene from PI 289824 conferring resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 110: 1439-1444.
- Ohlrogge, J.B. and J. Browse. 1995. Lipid biosynthesis. **Plant Cell.** 7: 957-970.
- _____, D.N. Kuhn, and P.K. Stumpf. 1979. Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 76: 1194-1195.
- Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biom. Bioen.** 19: 1-15.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis use single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 86: 2766-2770.
- Padmaja, K.L., N. Arumugam, V. Gupta, A. Mukhopadhyay, Y.S. Sodhi, D. Pental and A.K. Pradhan. 2005. Mapping and tagging of seed coat colour and the identification of microsatellite markers for marker-assisted manipulation of the trait in *Brassica juncea*. **Theor. Appl. Genet.** 111: 8-14.
- Pamidimarri, D.V.N., S.N Pandya, M. P. Reddy and T. Radhakrishnan. 2008. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. **Mol. Biol. Rept.** 10: 10-18.

- Paniego, N., M. Echaide, M. Muñoz, L. Fernández, S. Torales, P. Faccio, I. Fuxan, M. Carrera, R. Zandomeni, E. Y. Suárez and H. E. Hopp. 2001. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Genome** 45: 34–43.
- Rao, K.K., K.K. Jena and M.L. Narasu. 2003. Molecular tagging of a new bacterial blight resistance gene in rice using RAPD and SSR markers. **Plant Breed.** 28: 16-17.
- Rahman, M. H., S. Dayanandan and O. P. Rajora. 2000. Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. **Genome** 43: 293–297.
- Ram, S.G, K.T. Parthiban, R.S. Kumar., V. Thiruvengadam and M. Paramathma. 2009. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genet. Resour. Crop. Evol.** 55: 803-809.
- Raman, H., A. Karakousis, J.S. Moroni, R. Raman, B.J. Read, D.F. Garvin, L.V. Kochian and M.E. Sorrells. 2003. Development and allele diversity of microsatellite markers linked to the aluminium tolerance gene *Alp* in barley. **Aust. J. Agr. Res.** 54: 1315-1321.
- Ranadea, S.A., A.P. Srivastavaa, T.S. Ranab, J. Srivastavaa and R. Tulia. 2008. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biom. bioen.** 32: 533-540
- Richard G.F. and F. Pâques. 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. **EMBO Rept.** 11: 122-126.
- Ritschel, P.S., T.C.L. Lins, R.L. Tristan, G.S.C. Buso, J.A. Buso and M.E. Ferreira. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biol.** 4: 1-14.
- Salas, J.J. and J.B. Ohlrogge. 2002. Characterization of substrate specific of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterase. **Arch. Biochem. Biophys.** 403: 25-34.

Sato, Y. and T. Nishio. 2003. Mutation detection in rice waxy mutants by PCR-RF-SSCP.

Theor. Appl. Genet. 107: 560-567.

Shen, J.L., J.N. Xiang, G.N. Hui, P.G. Sun, N. Shi-hui and X.Y.Chen. 2010. AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* grown in Hainan, China. **Trees** (Published online: Springer, 20 January 2010)

Schmid, K.M. and J.B. Ohlrogge. 1996. Lipid metabolism in plants, pp.363-389. *In* Vance, D.E. and J.E. Vance. (eds). **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. Elsevier, Netherlands.

Schmook, B. and L. Serralta-Peraza. 1997. *J. curcas*: distribution and uses in the Yucatan Peninsula of Mexico. pp. 53-57. *In*: **Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas***. Giibitz, G.M., Mittelbach, M., Trabi, M. (Eds.), DBV. Graz.

Sherchan, D.P., Y.B. Thapa, R.J. khadka and T.P. Tiwari. 1989. **Effect of Green Manure on Rice Production**. PAC Occasional Paper. No.2, 12 p. Pakhribas Agricultural Centre. Dhankuta, Koshi Zone, Nepal.

Shokeen, B., N. K. Sethy, S. Kumar and S. Bhatia. 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers for analysis of molecular variation in the medicinal plant Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Plant Sci.** 172: 441-451.

Slabaugh M.B., G.M. Huestis, J. Leonard, J.L. Holloway, C. Rosato, V. Hongtrakul, N. Martini, R. Toepfer, M. Voetz, J. Schell and S.J. Knapp. 1997. Sequence-based genetic markers for genes and gene families: single-strand conformational polymorphism for the fatty acid synthesis genes of *Cuphea*. **Theor. Appl. Genet.** 94: 400-408.

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

- Suenaga, K., R.P. Singh and H.M. Manilal. 2001. **Tagging of Slow Rusting Genes for Leaf Rust, Lr34 and Lr46, using Microsatellite Markers in Wheat.** Available Source: (<http://ss.jircas.affrc.go.jp/english/publication/highlights/2001/pdf/2001-04.pdf>, Feb 1, 2007.)
- Sujatha, M., S.D. Basha, G. Francis, H.P.S. Makkar and K. Becker . 2008. 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
- Sun, M. and K.C. Wong. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **Am. J. Bot.** 88: 2180-2188.
- Tan, X.L., Y.L. Tan, Y.H. Zhao, X.M. Zhang, R.K. Hong, S.L. Jin, X.R. Liu, and D.J. Huang. 2004. Identification of the Rf gene conferring fertility restoration of the CMS Dian-type 1 in rice by using simple sequence repeat markers and advanced inbred lines of restorer and maintainer. **Plant Breed.** 123: 338-341.
- Tani, T., T. Ujino-Ihara, H. Iwata, K. Yoshimura and Y. Tsumura. 2004. Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. **Ann. For. Sci.** 61: 569-575.
- The Integrated Taxonomic Information System. 2008. **Taxonomy**, Available source; <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt>, April 10, 2010
- Tóth, G., Z. Gáspári and J. Jurka. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res.** 10: 967-981.
- Varshney, R. K., A. Graner and M. E. Sorrells. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Bio.** 23: 48-55.

- Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theor. Appl. Genet.** 88: 1-6.
- Watt, J.M. and M.G. Breyer-Brandwijk. 1962. **The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa.** E&S Livingstone, Edinburgh.
- Weber, J.L. and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be types using polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 388-396.
- Wei, Y.M., Y.C. Hou, Z.H. Yan, W. Wu, Z.O. Zhang, D.C. Liu and Y.L. Zheng. 2005. Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces highly resistant to *Fusarium* head blight. **J. Appl. Genet.** 46: 3-9.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.I. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.** 18:6231-6235.
- Wunsch, A. and J.I. Hormaza. 2007. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Sci. Hortic.** 113: 37-43.
- Varshney, R.K., T. Leela, P.W. Suhas, K. Seetha, B. Naresh, K.S. Thaku, A. H. David and D. Prathibha. 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science** 176: 505-513.
- Vikal, Y., P. Chhuneja, R. Singh and H.S. Dhaliwal. 2004. Tagging of an *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene Lr 28 with a microsatellite marker in wheat. **J. Plant Biochem. Biotechnol.** 13: 47-49.
- Vos, P., R. Hogers, M. Blecker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4414.

- Xing, Q.H., Z.G. Ru, C.J. Zhou, X. Xue, C.Y. Liang, D.E. Yang, D.M. Jin and B. Wang. 2003. Genetic analysis, molecular tagging and mapping of the thermo-sensitive genic male sterile gene (*wtms1*) in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 107: 1500-1504.
- Yaish, M.W.F. and M. Pérez de la Vega. 2003. Isoalation of (GA)_n microsatellite sequences and description of a predicted MADS-box sequence isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genet. Mol. Biol.** 3: 337-342.
- Yang, W., D.B. Weaver, B.L. Nielsen and J. Qiu. 2001. Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in 'Peking'. **Plant Breed.** 120: 73-78.
- Yong, X., M. Rong-Cai, X. Hua, L. Jian-Ting and C. Ming-Qing. 2004. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. **Genome** 47: 1091-1104.
- Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol. Ecol.** 11: 1-16.
- Zhu, Z., R. Zhou, X. Kong, Y. Dong and J. Jia. 2005. Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat. **Genome** 48: 585-590.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176-183.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวณัฐวี รัตนมณี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	23 กันยายน 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	กศ.บ. (การศึกษบัณฑิต) สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพ ชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (พ.ศ. 2545)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (MAG Window II) ปี 2550 - ได้รับทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภท วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา ปีงบประมาณ 2550 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ - ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสถาบันวิจัย และพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2548-9 และ 2551