การศึกษาเบื้องต้นของเครื่องหมาย SSR (simple sequence repeat) ที่พัฒนาจากการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ในสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.)

Preliminary Study of SSR Markers Developed by Next Generation Sequencing in *Jatropha curcas* L.

นิราภร สีวินทา, กัลยารัตน์ ภู่สุดแสวง และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ปัทมา ศิริธัญญา

สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา
ตำบลพิชัย อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง 52000

Niraporn Seewinta, Ganlayarat Bhusudsawang and Kittipat Ukoskit*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre, Klong Nueng, Klong Luang, Pathum Thani 12120

Pattama Sirithunya

Lampang Agricultural Research and Training Center, Rajamangala University of Technology, Lanna, Lampang, Phichai, Mueang, Lampang 52000

บทคัดย่อ

สบู่ดำเป็นหนึ่งในพืชหลายชนิดที่เป็นพลังงานชีวภาพและเป็นตัวเลือกที่สำคัญในการนำไปใช้ทดแทนการใช้น้ำมันดีเซล ดังนั้นความเข้าใจความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจึงเป็นสิ่งสำคัญในการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์และการวางแผนสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) 92 เครื่องหมาย ที่พัฒนาโดยวิธีการหาลำดับเบสใหม่ด้วยวิธี pyrosequencing ได้ถูกนำมาวิเคราะห์และใช้สำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำสายพันธุ์ที่เก็บมาจากภูมิภาคต่าง ๆ ในประเทศไทย และนำเข้าจากต่างประเทศ ผลการวิเคราะห์พบว่ามี 24 เครื่องหมาย ที่แสดงพอริมอร์ฟิซึมในสบู่ดำที่นำมาทดสอบ มีค่า polymorphic information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.02 ถึง 0.39 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.16 และมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.32 ถึง 1.00 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน พบว่าสามารถจัดสบู่ดำออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดย 2 สายพันธุ์ สบู่ดำที่ไม่มีพิษจากเม็กซิโกและ 2 สายพันธุ์ จากอเมริกาถูก

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** ku@tu.ac.th

แยกออกจากพันธุ์สบู่ดำอื่นอย่างชัดเจน

คำสำคัญ : สบู่ดำ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, เอสเอสอาร์

Abstract

Jatropha curcas L. is one of many plants that holds a great deal of promise as a biofuel and could emerge as a major alternative to diesel. Understanding diversity of *J. curcas* is important for germplasm collection and planning for breeding programs. Ninety two simple sequence repeat (SSR) markers developed by next generation pyrosequencing were characterized and used for evaluation of genetic diversity of *J. curcas* accessions collected from different regions within Thailand and introduced from other countries. Of the primer pairs tested, 24 identified polymorphism among all of *J. curcas*accessions examined. Polymorphic information content (PIC) value per SSR primer ranged from 0.02 to 0.39 with the average of 0.16. The similarity coefficient ranged from 0.32 to 1.00. Cluster analysis base on genetic similarity coefficient indicated four clusters which two non-toxic from Mexico and two USA accessions were clearly differentiated from other accessions.

Key words: *Jatropha curcas* L., genetic diversity, simple sequence repeat (SSR)

1. บทนำ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่มีคุณภาพน้ำมันสูง สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ต้องผสมน้ำมันชนิดอื่น สบู่ดำจึงเป็นพืชที่น่าสนใจโดยเฉพาะในภาวะปัจจุบันที่น้ำมันดีเซลมีราคาสูง นอกจากจะเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงที่สำคัญแล้ว เมล็ดสบู่ดำยังใช้ประโยชน์ในด้านการทำอาหารสัตว์ สารกำจัดศัตรูพืช และปุ๋ยอินทรีย์อีกด้วย [1]

การวิจัยเพื่อสร้างสายพันธุ์สบู่ดำที่มีความเป็นเลิศทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับช่วยในการคัดเลือกพันธุ์สบู่ดำ มีความจำเป็นสำหรับนักพันธุศาสตร์และนักปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) หรือไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการใช้ศึกษาพันธุศาสตร์ เนื่องจากมีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม มีการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั่วทั้งจีโนม ง่าย และรวดเร็วในการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ แต่การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์โดยวิธีมาตรฐานมีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก ใช้ทั้งเวลา และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง [2] สำหรับในสบู่ดำมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ยังจำกัดมาก [3,4]

ด้วยเทคโนโลยีรุ่นใหม่ของการหาลำดับเบสจีโนมโดยวิธี pyrosequencing ทำให้สามารถวิเคราะห์และอ่านลำดับเบสได้ยาวมากกว่า 400 bp สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอแต่ชิ้น และในการวิเคราะห์หนึ่งครั้งสามารถผลิตข้อมูลลำดับเบสได้มากกว่า 500 Mb (454 GS FLX Titanium Series) ทำให้การหาลำดับเบส

จีโนมสามารถทำได้ไม่ยากในสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสซ้ำมาก เช่น ในพืช สบู่ดำนับเป็นพืชในตระกูล *Euphorbiaceae* ที่มีจีโนมขนาดเล็ก คือ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 ปริมาณ GC มีจำนวนใกล้เคียงกับ *Arabidopsis* ค่าประมาณขนาดจีโนมมีค่าใกล้กับข้าว คือ 430 Mb [5] ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีโนมในสบู่ดำจึงมีความสะดวกรวดเร็วและสามารถนำข้อมูลลำดับเบสจีโนมมาทำการค้นหา (data mining) และพัฒนาเครื่องหมาย SSR ได้ง่าย โดยในโครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับรายงานวิจัยนี้ได้หาลำดับเบสของจีโนมสบู่ดำโดยวิธี pyrosequencing และพัฒนาเครื่องหมาย SSR ไว้เป็นจำนวนมาก (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, unpublished data)

งานวิจัยนี้เป็นการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของเครื่องหมาย SSR บางส่วนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ ข้อมูลจากผลการทดลองของงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำได้เป็นอย่างดี

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชทดลอง

ตัวอย่างสบู่ดำที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 43 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสบู่ดำจาก 4 พื้นที่ภูมิประเทศที่แตกต่างกันในประเทศไทย คือ 13, 9, 5 และ 3 ตัวอย่าง จากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ตามลำดับ และ 12 ตัวอย่าง จากต่างประเทศที่มาจากต่างทวีปกัน โดยประกอบด้วย 6 ตัวอย่าง จากทวีปเอเชีย คือ 1 ตัวอย่าง จากลาว ศรีลังกา อินเดีย 3 ตัวอย่าง จากพม่า และ 2 ตัวอย่าง จากทวีปแอฟริกา คือ เซเนกัลและแอฟริกาใต้ และ 4 ตัวอย่าง จากทวีปอเมริกา คือ 2 ตัวอย่าง จากเม็กซิโก และ 2 ตัวอย่าง อเมริกา โดยมีเข็มขาว (*Ixora coccinea* L.) ซึ่งเป็นพืชที่สามารถผสมข้ามกับสบู่ดำและอยู่ในตระกูลเดียวกับสบู่ดำเป็น outgroup ตัวอย่างทั้งหมดนี้ถูกใช้เพื่อการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอลลีลและพอลิมอร์ฟิซึม เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย SSR และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างที่นำมาศึกษา สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบสบู่ดำทั้งหมดด้วยวิธีของ Gawel และ Jarret [6] วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงร่วมกับการสังเกตการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลอะกาโรส 1 %

2.2 เครื่องหมาย SSR

เครื่องหมาย SSR ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 92 เครื่องหมาย ที่ได้รับการพัฒนาด้วยวิธีการหาลำดับเบสดีเอ็นเอทั้งจีโนมของสบู่ดำสายพันธุ์เม็กซิโกโดยใช้วิธี pyrosequencing (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, unpublished data) ทำการค้นหาลำดับเบส SSR จากลำดับเบสจีโนมทั้งชนิดที่เป็น perfect repeats และ compound repeats โดยกำหนดจำนวนซ้ำขั้นต่ำของ di-repeat,tri-repeat, tetra-repeat, penta-repeat และ hexa-repeat เป็น 7, 5, 4, 4 และ 3 ตามลำดับ แล้วออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 [7] จากข้อมูลลำดับเบสเหล่านั้น โดยการกำหนด parameter ต่าง ๆ ในการออกแบบไพรเมอร์ดังนี้ ค่า GC content อยู่ระหว่าง 50-75 เปอร์เซ็นต์ annealing temperature อยู่ระหว่าง 50-65 °C และผลผลิตพีซีอาร์อยู่ระหว่าง 150-400 คู่เบส

2.3 การคัดเลือกและประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย SSR

จากการวิจัยก่อนหน้า [8] สายพันธุ์ลำปางและเม็กซิโกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจึง

ถูกนำมาใช้ในการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและคัดเลือกไพรเมอร์ 92 ไพรเมอร์ ก่อนที่จะนำไปศึกษาในสบู่ดำทั้งหมด โดยองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์มีปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 20 ng, 1X PCR buffer pH 9.0, 20 mM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, *Taq* DNA polymerase จำนวน 0.5 U, forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 0.175 µM อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที และต่อด้วย 35 รอบ อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที อุณหภูมิช่วง annealing เปลี่ยนแปลงตามชนิดของไพรเมอร์ 30 วินาที และ 72 °C 2 นาที จากนั้นอุณหภูมิที่ 72°C 5 นาที หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะถูกนำมาทดสอบเบื้องต้นโดยอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลอะกาโรมีความเข้มข้น 1.8 % หลังจากคัดเลือกเครื่องหมาย SSR เบื้องต้นแล้ว ได้นำเครื่องหมายที่คัดเลือกได้มาศึกษาในสบู่ดำทั้ง 43 ตัวอย่าง โดยใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์และอุณหภูมิเดียวกับขั้นตอนการคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ถูกนำไปทำการวิเคราะห์หาพอลิมอร์ฟิซึมด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 6 % ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารย้อมซิลเวอร์ [9]

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกผลสำเร็จของการทำพีซีอาร์ บันทึกแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย SSR เป็นจีโนไทป์ที่ประกอบด้วยคู่ของแอลลีล วิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย SSR ด้วยโปรแกรม Power Marker V 3.25 [10] ซึ่งประกอบด้วยจำนวนจีโนไทป์ (NG) จำนวนแอลลีล (NA) ค่า gene diversity (GD) และค่า polymorphic information content (PIC) [11] คำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) [12] ของคู่เครื่องหมาย SSR แล้วนำค่าดัชนีความเหมือนนี้มาสร้างเป็นเดนโดแกรม (dendrogram) โดยใช้วิธี unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS pc-2.01 [13]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเครื่องหมาย SSR

จากไพรเมอร์ SSR ทั้งหมด 92 คู่ เมื่อทดสอบกับสบู่ดำ 2 ตัวอย่าง คือ ลำปางและเม็กซิโก เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการเกิดพอลิมอร์ฟิซึมเบื้องต้น ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงในตารางที่ 1 ผลสำเร็จของการทำพีซีอาร์มีอัตรา 57.60 เปอร์เซ็นต์ (53/92) ผลผลิตพีซีอาร์ที่สามารถให้คะแนนได้ (มีหนึ่งหรือสองแถบที่ชัดเจน) มี 31.50 เปอร์เซ็นต์ (29/92) ของไพรเมอร์ทั้งหมด และ 26.10 เปอร์เซ็นต์ (24/92) ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีหลายแถบดีเอ็นเอ จากจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมดที่นำมาทดสอบมี 26.10 เปอร์เซ็นต์ (24/92) ที่มีพอลิมอร์ฟิซึม ระหว่างตัวอย่างสบู่ดำทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งไพรเมอร์ที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมนี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเครื่องหมาย SSR จำนวน 92 คู่

PCR evaluation	Number (%)
PCR success rate	53 (57.60)
None PCR product	39 (42.40)
Scorable PCR product	29 (31.50)
Multiple band PCR product	24 (26.10)
Polymorphism rate	24 (26.10)

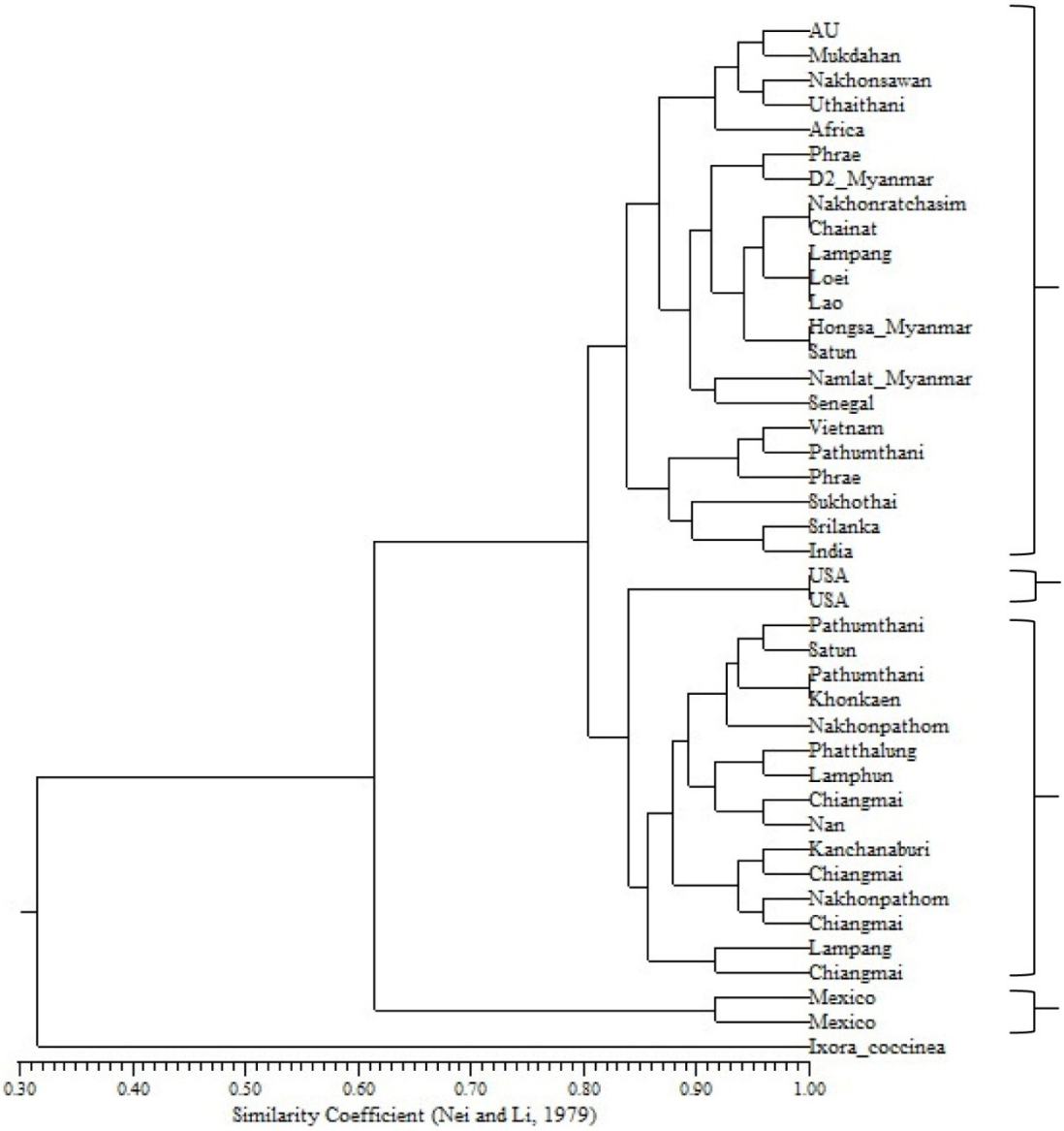
ผลการวิจัยนี้พบว่าอัตราความสำเร็จของการทำพีซีอาร์มีสัดส่วนสูงเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Wen และคณะ [14] ในส่วนที่ใช้ genomic SSR ซึ่งมีอัตราความสำเร็จอยู่ที่ 37.56 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยของ Saisug และ Ukoskit [15] กับ Wen และคณะ [14] ในส่วนที่ใช้เครื่องหมาย EST-SSR พบว่ามีอัตราความสำเร็จของการทำพีซีอาร์ของการทดลองทั้งสองอยู่ที่ 97.70 และ 55.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการพัฒนาเครื่องหมาย SSR แบบ EST-SSR ให้อัตราความสำเร็จของการทำพีซีอาร์สูงกว่าเครื่องหมาย genomic SSR ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสจีโนมทั้งหมด (whole genome) ของสบู่ดำซึ่งมีโอกาสที่ไพรเมอร์จะถูกออกแบบในตำแหน่งที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) สูงกว่าตำแหน่งที่เป็นยีน (coding region) จึงอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอค่อนข้างน้อยกว่าเครื่องหมาย EST-SSR เนื่องจากส่วนที่ไม่ใช่ยีนลำดับเบสจะมีความอนุรักษ์น้อยกว่า ซึ่งในสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนไทป์ต่างกันจะมีโอกาสที่ลำดับเบสในบริเวณที่ไม่ใช่ยีนมีความแตกต่างกัน โดยอาจส่งผลต่อการประสิทธิภาพการจับของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอต้นแบบ นอกจากนี้ยังพบจำนวนไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีหลายแถบดีเอ็นเอค่อนข้างมาก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอตำแหน่งเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรืออาจเกิดจากดีเอ็นเอเป้าหมายมีการปรากฏหลายตำแหน่งในจีโนม

3.2 การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมาย SSR

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมาย SSR จึงทำการวิเคราะห์พอลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย SSR ทั้ง 24 เครื่องหมาย ในตัวอย่างจำนวน 43 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์พบว่ามีจำนวนแอลลีลทั้งหมด 53 แอลลีล ประกอบเป็นจีโนไทป์ 56 จีโนไทป์ โดยจำนวนของจีโนไทป์มีช่วงตั้งแต่ 2 ถึง 4 จีโนไทป์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.33 ± 0.56 และจำนวนของแอลลีลมีช่วงตั้งแต่ 2 ถึง 3 แอลลีล เฉลี่ยเท่ากับ 2.21 ± 0.41 ค่า gene diversity มีช่วงตั้งแต่ 0.02 ถึง 0.50 เฉลี่ย 0.20 ± 0.19 ค่า PIC มีช่วงตั้งแต่ 0.02 ถึง 0.39 เฉลี่ยเท่ากับ 0.16 ± 0.14 (ตารางที่ 2) เมื่อเทียบกับผลการทดลองของ Wen และคณะ [12] ในส่วนที่ใช้เครื่องหมาย genomic SSR 20 เครื่องหมาย กับสบู่ดำทั้งหมด 45 ตัวอย่าง พบจำนวนแอลลีลที่มากกว่าคือ 64 แอลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.32 ซึ่งถือว่าเครื่องหมาย SSR ที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้มีระดับพอลิมอร์ฟิซึมอยู่ในระดับที่ไม่สูงมากนัก อย่างไรก็ตาม ระดับการเกิดพอลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมายขึ้นอยู่กับจำนวนและระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมาย เช่น ในกรณีงานวิจัยของ Saisug และ Ukoskit [11] ใช้เครื่องหมาย EST-SSR 71 เครื่องหมาย วิเคราะห์ในสบู่ดำ 59 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสบู่ดำในชุดเดียวกันกับการทดลองนี้ แต่ใช้จำนวนพันธุ์สบู่ดำมากกว่า พบว่าค่าเฉลี่ย PIC เท่ากับ 0.37

3.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

เมื่อวิเคราะห์เครื่องหมาย SSR ทั้งหมด 24 เครื่องหมาย กับตัวอย่างสบู่ดำจำนวน 43 ตัวอย่าง แล้วคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) แล้วจัดกลุ่มความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และแสดงผลในรูปแบบเดนโดแกรม (dendrogram) พบว่าตัวอย่างสบู่ดำที่



รูปที่ 1 แผนภาพเดนโดแกรม (dendrogram) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างสบู่ดำ จำนวน 43 ตัวอย่างจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 24 เครื่องหมาย

ศึกษาสามารถแยกออกจากเข็มขาวที่ถูกใช้เป็น outgroup ได้อย่างชัดเจน มีค่าดัชนีความเหมือนในกลุ่มสบู่ดำอยู่ระหว่าง 0.54 ถึง 1.00 ซึ่งมีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.81 แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่างทั้ง 43 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างมาก หรือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่สูงมากนัก

ตัวอย่างสบู่ดำที่นำมาศึกษาสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม (รูปที่ 1) โดยในกลุ่มที่ 1 พบสายพันธุ์จากต่างประเทศถูกจัดกลุ่มรวมกับสายพันธุ์ภายใน

ประเทศอยู่บ้าง และส่วนใหญ่เป็นประเทศในแถบทวีปเอเชีย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าสบู่ดำไม่ใช่พืชพื้นเมืองของประเทศในแถบเอเชีย สำหรับประเทศไทยคาดว่าสบู่ดำถูกนำเข้ามาในช่วงคริสต์ศตวรรษที่ 18 หรือช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยาโดยพ่อค้าชาวโปรตุเกส [1] เพราะฉะนั้นแต่ละประเทศก็อาจมีการนำสบู่ดำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจจะเอามาจากแถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นแหล่งกำเนิดของสบู่ดำ [6] ดังนั้นประเทศต่าง ๆ ในกลุ่มนี้ก็อาจจะเป็นไปได้ว่านำพันธุ์สบู่ดำมาจากต่างประเทศเช่นกัน และเกิดการเคลื่อนย้ายแหล่งพันธุกรรมระหว่างประเทศกันในประเทศแถบเอเชีย ผลการทดลองนี้ (โดยใช้เครื่องหมาย 24 เครื่องหมาย) จึงไม่สามารถแยกพันธุ์จากต่างประเทศออกจากพันธุ์ในประเทศไทยได้ กลุ่มที่ 2 เป็น 2 สายพันธุ์ จากอเมริกา ซึ่งถูกจัดแยกออกจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอเมริกาอยู่ใกล้กับแหล่งกำเนิดของสบู่ดำจึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงและเมื่อพิจารณาในกลุ่มที่ 3 พบว่าเป็นกลุ่มที่มีสายพันธุ์ภายในประเทศไทยทั้งหมดโดยมีค่าดัชนีความเหมือนโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 0.92 การเกิดกลุ่มย่อยของสายพันธุ์สบู่ดำกลุ่มนี้อาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายแหล่งพันธุกรรมแบบไม่อาศัยเพศ (กิ่งชำ) ภายในประเทศ จึงทำให้เกิดเป็นโครงสร้างประชากรย่อยขึ้น ส่วนกลุ่มที่ 4 สายพันธุ์เม็กซิโก 2 สายพันธุ์ ถูกจัดแยกออกจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน อาจเนื่องมาจากว่าเม็กซิโกเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีสารพิษและอยู่ในถิ่นกำเนิดของสบู่ดำ จึงมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์อื่นที่มีพิษทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์เม็กซิโกมี 4 เครื่องหมาย คือ JGM002, JGM012, JGM013 และ JGM029 ซึ่งอาจนำไปศึกษา

ตารางที่ 2 ความแปรปรวนแอลลีลของเครื่องหมาย SSR จำนวน 24 เครื่องหมาย

Marker	Motif	NG	NA	GD	PIC
JGM002	$(AC)_{18}$	2	2	0.04	0.04
JGM010	$(AG)_{15}$	2	2	0.02	0.02
JGM011	$(GA)_{15}$	2	2	0.02	0.02
JGM012	$(AG)_{15}$	3	3	0.48	0.39
JGM013	$(AG)_{15}$	3	3	0.13	0.12
JGM026	$(AT)_{13}$	2	2	0.50	0.37
JGM029	$(TC)_{12}$	4	3	0.26	0.23
JGM042	$(TC)_{11}(TG)_{7}$	2	2	0.02	0.02
JGM047	$(TC)_{11}$	2	2	0.48	0.36
JGM049	$(CT)_{11}$	2	2	0.02	0.02
JGM053	$(CT)_{11}$	2	2	0.02	0.02
JGM056	$(TG)_{11}$	2	2	0.02	0.02
JGM057	$(TC)_{11}$	3	2	0.49	0.37
JGM061	$(CT)_{11}$	2	2	0.04	0.04
JGM064	$(AG)_{11}$	2	2	0.41	0.33
JGM067	$(TC)_{10}$ $(TA)_{8}(CA)_{6}$	2	2	0.34	0.28
JGM073	$(TA)_{10}$	3	3	0.13	0.12
JGM076	$(CT)_{10}$	2	2	0.02	0.02
JGM077	$(AT)_{10}$	3	3	0.13	0.12
JGM078	$(GA)_{10}$	3	2	0.50	0.37
JGM079	$(GA)_{10}$	2	2	0.02	0.02
JGM082	$(AT)_{10}$	2	2	0.41	0.32
JGM087	$(TC)_{10}$	2	2	0.02	0.02
JGM091	$(AG)_{10}$	2	2	0.25	0.22
Mean		2.33	2.21	0.20	0.16

NG = number of genotype, NA = number of allele,

GD = gene diversity, PIC = polymorphic information content

ต่อว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะการมีสารพิษของสบู่ดำหรือไม่อย่างไร

จากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน พบว่าสายพันธุ์ที่มีความต่างกันที่สุด คือ เม็กซิโกกับลำปาง เม็กซิโกกับเชียงใหม่ เม็กซิโกกับน่าน ซึ่งมีค่า similarity coefficient เท่ากัน คือ 0.54 ข้อมูลความแตกต่างทางพันธุกรรมเหล่านี้ เป็นข้อมูลสำคัญในการวางแผนการผสมพันธุ์สบู่ดำในโครงการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ

4. สรุป

เครื่องหมาย SSR ที่พัฒนาจากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอจีโนมโดยวิธี pyrosequencing ซึ่งเป็นที่สะดวกกว่าและมีค่าใช้จ่ายต่อเครื่องหมายถูกกว่า การพัฒนาเครื่องหมาย SSR โดยวิธีมาตรฐานสามารถนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์สบู่ดำในประเทศที่ไม่สูงมากนัก ขณะเดียวกันสามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมของสบู่ดำสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งกำเนิดคือเม็กซิโกและอเมริกาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ และใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่ของสบู่ดำที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงที่สุด เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ของสบู่ดำต่อไป

5. เอกสารอ้างอิง

[1] สถาบันวิจัยพืชไร่, 2552, สบู่ดำ, กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

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

[3] Sudheer, P., Rahman, H., Mastan, S. and Reddy, M., 2006, Isolation of novel microsatellites using FIASCO by dual probe enrichment from *Jatropha curcas* L. and study on genetic equilibrium and diversity of Indian population revealed by isolated microsatellites, Mol. Bio. Rep. 37: 3785-3793.

[4] Pamidimarri, D.V.N.S., Sinha, R., Kothari, P. and Reddy, M.P., 2009, Isolation of novel microsatellites from *Jatropha curcas* L. and their cross-species amplification, Mol. Eco. Res. 9: 431-433.

[5] Carvalho, C.R., Clarindo, W.R., Praca, M.M., Araujo, F.S. and Carels, N., 2008, Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant, Plant Sci. 174: 613-617.

[6] Gawel, N. and Jarret, R., 1991, A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*, Plant Mol. Biol. Rep. 9: 262-266.

[7] Rozen, S. and Skaletsky, H.J., 2000, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, pp. 365-386, In Krawets, S. and Misener, S. (Eds.), Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey.

[8] วชิร สายสุข, 2554, การวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) และประสิทธิภาพของการถ่ายโอนข้ามสกุลของพืชในวงศ์ Euphorbiaceae โดยใช้เครื่องหมาย ILP และ EST-SSR,วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี, 62 น.

[9] Benbouza, H., Jacquemin, J.M, Baudoin, Y. and Mergeai, G., 2006, Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10: 77-81.

[10] Liu, K. and Muse, S.V., 2004, Power Marker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis, Bioinformatics 21: 2128-212.

[11] Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Voges, J., Tingey, S. and Rafalski, A., 1996, A comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis, Mol. Breed. 2: 230-236.

[12] Nei, M. and Li, W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5269-5273.

[13] Rohlf, F.J., 1998, NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02, Exeter Software, Setauket.

[14] Wen, M., Wang, H., Xia, Z., Zou, M., Lu, C. and Wang W., 2010, Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L., BMC Res. Notes 3: 42.

[15] Saisug, W. and Ukoskit, K., 2013, Comparative analysis of EST-derived markers for allelic variation in *Jatropha curcas* L. and cross transferability among economically important species of Euphorbiaceae, Genes Genom. 35: 1-12.

[16] Jules, J. and Robert, E.P., 2008, The encyclopedis of fruit & nuts, Cambridge University Press, Cambridge, 160 p.