Thai Journal of Genetics 2009, 2(2) : 145–154

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสบู่ดำ

Development of microsatellite markers for *Jatropha curcas* L.

ญาตวี รัตนมณี สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล นิตย์ศรี แสงเดือน และ วิภา หงษ์ตระกูล*

Yatavee Rattanamanee, Surin Peyachoknagul, Nitsri Sangduen and Vipa Hongtrakul*

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

**Corresponding author: fscivph@ku.ac.th*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์การวิจัยเพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดไมโครแซทเทลไลท์ในสบู่ดำ *(Jatropha curcas* L.) เพื่อการจัดจำแนกพันธุ์และระบุพันธุ์จำเพาะ โดยนำดีเอ็นเอจากสบู่ดำพันธุ์ SS20-Sbr3 สหรัฐอเมริกา และนครราชสีมา มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I แล้วเชื่อมต่อกับ adapter และเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นทำไฮบริไดเซชันเพื่อคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอ ที่มีลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้ไบโอตินโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ B-$(GA)_{15}$, B-$(CA)_{15}$, B-$(ACC)_{10}$ และ B-$(CCT)_{10}$ ร่วมกับ magnetic beads และเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์กับ beads โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ก่อนเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ จากนั้นถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *E. coli* JM109 (supercompetent cell) โดยวิธี heat shock คัดเลือกโคโลนีสีขาวรวม 996 โคลน มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ในส่วนของพลาสมิด พบพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ 906 โคลน คิดเป็น 90.96 % ของโคลนที่สุ่มเลือกมาทั้งหมด ตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมว่ามีชิ้นดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ โดยการทำ dot blot hybridization เลือกโคลนที่สามารถไฮบริไดซ์กับโพรบที่เป็นชุดซ้ำได้ชัดเจนบนแผ่นฟิล์ม 97 โคลน นำมาสกัดพลาสมิด และนำไปหาลำดับเบส พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์รวม 51 โคลน คิดเป็น 52.58 % ของโคลนที่ส่งหาลำดับเบส โดยส่วนใหญ่เป็นลำดับไมโครแซทเทลไลท์แบบ di-nucleotide repeat ชนิด $(GA)_n$ คิดเป็น 31.37 % และ tri-nucleotide repeat $(GGA)_n$ คิดเป็น 23.53 % สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 26 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์ 4 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตามที่คาดหวัง และให้ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอในตัวอย่างสบู่ดำพันธุ์มีพิษและไม่มีพิษได้

ABSTRACT

The objective of this research is to develop microsatellite DNA markers for classification and species specific identification of physic nut (*Jatropha curcas* L.). DNAs from physic nut (SS20-Sbr3, USA, Nakhon Ratchasima) were digested with *Mse*I restriction enzyme, then ligated to adapters. The products were PCR amplified before hybridization to biotin-oligonucleotide probes of B-$(GA)_{15}$, B-$(CA)_{15}$, B-$(ACC)_{10}$ and B-$(CCT)_{10}$ containing magnetic beads. The DNA fragments were then PCR amplified again before ligation to plasmid vector. The recombinant plasmids were heat-shock transformed to supercompetent *E. coli*

JM109 cells. A total of 996 white colonies were selected and 906 clones (90.96 %) were confirmed to carry DNA inserts by PCR amplification using primers specific to the plasmid. Dot blot hybridization was performed to reconfirm the microsatellite sequences in the inserts. Ninety-seven clones were selected and sequenced. A total of 51 clones (52.58 %) were found to contain microsatellite sequences. Most abundant iterated sequences were di-nucleotide repeat of $(GA)_n$ (31.37 %) and tri-nucleotide repeat of $(GGA)_n$ (23.53 %). Twenty six primer pairs were designed and four pairs could amplify the DNA, giving the expected PCR product with polymorphism among toxic and non-toxic physic nuts.

คำสำคัญ: เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์, สบู่ดำ
Keywords: microsatellite markers, *Jatropha curcas* L.

บทนำ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง ซึ่งน้ำมันสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลโดยที่ไม่ต้องผสมน้ำมันชนิดอื่น อีกทั้งยังปลูกง่าย พบกระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาคในประเทศ แม้ในพื้นที่ที่มีสภาพแห้งแล้ง สบู่ดำจึงเป็นพืชที่น่าสนใจ โดยเฉพาะในภาวะปัจจุบันที่น้ำมันดีเซลมีราคาสูง สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นพืชกลุ่มเดียวกับยางพารา มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลาง ประเทศเม็กซิโก นำเข้ามาในประเทศไทยโดยพ่อค้าชาวโปรตุเกส เพื่อนำเมล็ดไปอัดบีบน้ำมันมาทำสบู่ และใช้จุดไฟให้แสงสว่างในเวลากลางคืน สบู่ดำมีชื่อเรียกแตกต่างไปตามท้องถิ่นภูมิภาค เช่น ภาคเหนือ เรียก มะหุ่งฮั้ว ภาคอีสาน เรียก มะเยา หรือสีหลอด ส่วนภาคใต้ เรียก หงเทศ หรือ มาเคาะ (พรชัย, 2549) มีสารไฮโดรไซยานิก (hydrocyanic) ซึ่งมีกลิ่นเหม็นเขียว จึงนิยมปลูกทำเป็นแนวรั้ว ป้องกันสัตว์เลี้ยงไม่ให้เข้าไปทำลายแปลงพืชผล (ปรัชญา, 2537) น้ำมันสามารถใช้บำรุงรากผม มีสารพิษที่เรียกว่า curcin และสารพวก resin เจือปนอยู่ หากบริโภคจะทำให้ท้องเดิน และเสียชีวิตได้ จึงใช้ทำยาฆ่าแมลง กากเมล็ดที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน มีปริมาณไนโตรเจนสูง ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการ จึงนิยมใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ และสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้อีกด้วย

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรม และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชและสัตว์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นการศึกษาในระดับโมเลกุล มีทั้งที่เป็นเครื่องหมายประเภทที่มีการข่มสมบูรณ์ (dominant marker) เช่น AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) และ RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) และเครื่องหมายที่มี การข่มร่วม (co-dominant marker) เช่น RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), SSCPs (Single Strand Conformational Polymorphisms) และ SSRs (Simple Sequence Repeats) หรือ STRs (Short Tandem Repeats) หรือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ เป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ใน จีโนมชุดที่ซ้ำกันนี้ จะอยู่ติดกันแบบหัวต่อหาง และมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ลำดับซ้ำที่พบมากที่สุด ได้แก่ di- และ tri-nucleotide repeats ซึ่งพบทั้งในยูแคริโอต (Morgante *et al*., 2002) และโพรแคริโอต (Gur-Arie *et al*., 2000) ส่วนมากพบในบริเวณที่ไม่ใช่รหัสในการสร้างโปรตีน (Paniego *et al*., 2001) และพบกระจายทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างฮอโมไซโกตกับเฮเทอโรไซโกตได้ ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์มีอัตราการกลายสูงกว่าลำดับเบสทั่วๆ ไป โดยการกลายของไมโครแซทเทลไลท์ มักเกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนชุดซ้ำ ซึ่งมีกลไก 2 แบบ คือ การเลื่อนของสายดีเอ็นเอที่จับคู่กันขณะเกิดการจำลอง

โมเลกุล (slip-strand mispairing หรือ slippage) (Levinson and Gutman, 1987) และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เท่ากัน (unequal crossing over) (Richard and Pâques, 2000) มีวิธีการตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสด้านข้าง (flanking sequences) ของลำดับเบสซ้ำ และเพิ่มปริมาณในตำแหน่งที่แน่นอน เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ทำได้ง่าย และรวดเร็ว (Weber and May, 1989) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาจำเป็นต้องทราบลำดับเบสของจีโนมก่อน เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การทำแผนที่จีโนม เช่น ข้าว (Panaud and Chen, 1996) และถั่วแดง (Gaitan-Solis *et al*., 2002) เป็นต้น การจำแนกพันธุ์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ลูกผสม เช่น การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ และความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (ณัฏยา, 2545) และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (นฤมล และคณะ, 2547) การปรับปรุงพันธุ์พืชต่างๆ เช่น การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์คัดเลือกต้นพริกที่มีลักษณะต้านทานโรค (อรรัตน์, 2543) การศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganal, 2002)

ปัจจุบันในหลายพื้นที่ของประเทศไทยเริ่มมีการปลูกสบู่ดำอย่างจริงจัง และมีโครงการที่จะปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิต จึงมีการนำพันธุ์จากต่างประเทศเข้ามา เพื่อปลูกทดสอบเปรียบเทียบกับพันธุ์ในประเทศ อย่างไรก็ตามข้อมูลทางพันธุกรรมสบู่ดำมีน้อยมาก งานวิจัยส่วนใหญ่เป็นงานด้านการรวบรวมพันธุ์ ขยายพันธุ์ เขตกรรม และการศึกษาด้านผลผลิต จากข้อมูลการตรวจสอบพันธุกรรมสบู่ดำเบื้องต้นในประเทศไทย พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างต่ำ งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้สูง เพื่อใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมสบู่ดำที่นำเข้าจากต่างประเทศ และที่ปลูกกระจายอยู่ในประเทศไทย และใช้ตรวจสอบพันธุ์เพื่อประโยชน์ในการรับรองพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และพัฒนาพันธุ์ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืช และการสกัดดีเอ็นเอ

รวบรวมพันธุ์สบู่ดำทั้งภายในประเทศไทยและต่างประเทศจำนวน 114 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนสบู่ดำตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) โดยเตรียมสารละลาย 3X CTAB [3 % CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1 % PVP (polyvinylpyrrolidone)] ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C ประมาณ 20 นาที บดตัวอย่างใบอ่อนสบู่ดำด้วยไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างประมาณ 2 กรัมใส่หลอดเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol [24:1(v/v)] ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมา เป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดสารละลายใสตอนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม CTAB 10 % (10 % CTAB, 0.7 M NaCl) ปริมาตร 1/10 เท่า และ chloroform : isoamyl alcohol [24:1(v/v)] ปริมาตรเท่ากับสารละลาย กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดสารละลายใสตอนบนใส่หลอดใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลสัมบูรณ์ ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลาย และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 % และ 90 % ตามลำดับ ปล่อยให้ตะกอนแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) เติมเอนไซม์ RNase A (1 ไมโครกรัม/

ไมโครลิตร) 1-4 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 %

การสร้างห้องสมุดไมโครแซทเทลไลท์ และออกแบบไพรเมอร์

สร้างห้องสมุดไมโครแซทเทลไลท์ตามวิธีที่ประยุกต์จาก Edwards *et al.* (1996) นำจีโนมิกดีเอ็นเอสบู่ดำ 1 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I (Fermentas, USA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน แล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ตัดโดยสมบูรณ์เข้ากับ *Mse*I adapter เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ และนำมาทำไฮบริไดเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยว ที่มีลำดับเบสซ้ำไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 4 ชนิด คือ $(GA)_{15}$, $(CA)_{15}$, $(ACC)_{10}$ และ $(CCT)_{10}$ แต่ละชนิดติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วยไบโอติน ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่เคลือบอยู่บน magnetic beads (Dynal, Invitrogen, Norway) แยกชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้แม่เหล็ก นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีพีซีอาร์ ก่อนเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM®-T Vector (Promega, USA) และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ด้วยวิธีพีซีอาร์ ยืนยันการมีลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ในแต่ละโคลนด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยใช้ Biotin Luminescent Detection Kit (Roche, Germany) สกัดพลาสมิด ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมส่วนไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้โปรแกรม fastPCR ไพรเมอร์แต่ละเส้นมีความยาว 19-23 เบส โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์มีค่า T_m ใกล้เคียงกัน

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ ปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร, คู่ไพรเมอร์ (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, 2 mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 1.25 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 12.5 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ XP thermal cycler (Bioer, China) โปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ ขั้นที่ 1 94 °C เป็นเวลา 3 นาที, ขั้นที่ 2 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, ขั้นที่ 3 55-60 °C เป็นเวลา 30 วินาที, ขั้นที่ 4 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 35 รอบ และขั้นที่ 5 72 °C เป็นเวลา 4 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในเจลพอลิอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 10 % และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

ผลการทดลองและวิจารณ์

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

นำดีเอ็นเอจากสบู่ดำพันธุ์ FF20-Sbr3, สหรัฐอเมริกา และนครราชสีมา มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I แล้วเชื่อมต่อกับ adapter เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และทำไฮบริไดเซชันโดยใช้ไบโอตินโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ B-$(GA)_{15}$, B-$(CA)_{15}$,B-$(ACC)_{10}$ และ B-$(CCT)_{10}$ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ก่อนเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ และถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* คัดเลือกโคลนในอาหารแข็งสูตร LB ที่เติม X-gal, IPTG และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน โดยเลือกโคโลนีสีขาวได้รวม 996 โคลน ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะบนพลาสมิด พบว่าได้พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ 906 โคลน คิดเป็น 90.96 % ของโคลนที่สุ่ม

เลือกมาทั้งหมด ตรวจสอบการมีชิ้นดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ในแต่ละโคลน โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ไปหยดลงบน nylon membrane เพื่อทำ dot blot hybridization เลือกโคลนที่สามารถไฮบริไดซ์กับโพรบ ที่เป็นชุดซ้ำได้ชัดเจนบนแผ่นฟิล์มทั้งหมด 108 โคลน คิดเป็น 11.92 % ของโคลนที่นำมาทำ dot blot hybridization นำโคลนที่ได้มาสกัดพลาสมิดและนำไปหาลำดับเบสจำนวน 97 โคลน รวมโคลนที่มีลำดับเบสซ้ำกันเข้าด้วยกัน พบโคลนที่สามารถออกแบบไพรเมอร์ขนาบข้าง บริเวณที่มีลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ได้จำนวน 25 โคลน นำไปพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะได้ทั้งหมด 26 คู่ โคลนละอย่างน้อย 1 คู่ไพรเมอร์ โดยอาศัยหลักการออกแบบไพรเมอร์ทั่วไป และโปรแกรมคอมพิวเตอร์ fastPCR โดยมีโคลนที่มีลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ แต่ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 26 โคลน เนื่องจากลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์อยู่ใกล้กับตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Mse*I และโคลนที่ไม่มีลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ 9 โคลน (Table 1)

ชนิดของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์

ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite motifs) ที่พบมีทั้งชนิดซ้ำ 2 เบส (di-nucleotide repeat) ชนิดซ้ำ 3 เบส (tri-nucleotide repeat) และชนิดซ้ำแบบผสม (compound repeat) (Table 2) โดยรวมพบลำดับเบสชนิด di-nucleotide repeat มากที่สุด (47.06 %) รองลงมาเป็น tri-nucleotide repeat (29.41 %) และ compound repeat (23.53 %) ตามลำดับ ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ที่พบมากที่สุดเป็น di-nucleotide repeat ชนิด $(GA)_n$ คิดเป็น 31.37 % ของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบใน อะโวกาโด (Ashworth *et al.*, 2004) จากรายงานการสำรวจลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ชนิดต่างๆ พบว่าพืชส่วนใหญ่มีลำดับเบสซ้ำเป็นชนิด $(AT)_n$ รองลงมาคือ $(GA)_n$ และ $(CA)_n$ ตามลำดับ (Wang *et al.,* 1994; Lagercrantz *et al.*, 1993; Morgante and Oliveiri, 1993) แต่งานวิจัยนี้ไม่ได้ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบชนิด $(AT)_n$ เนื่องจาก $(AT)_n$ มักจะเกิดการจับกันเอง ลำดับเบส

Table 1 Number of clones and DNA sequences from successive stages in marker development.

Successive stages in marker development	*J. curcas cu*ltivars			Total (clones)
	FF20-Sbr3	USA	Nakhon Ratchasima	
1. Number of clones from transformation	602	78	316	996
2. Number of clones selected by PCR	516	78	312	906
3. Number of positive clones detected by dot blot hybridization	48	12	48	108
4. Number of clones sequenced	37	12	48	97
5. Number of microsatellite sequences: able to be used for primer design	10	4	11	25
6. Number of microsatellite sequences: unable to be used for primer design	8	5	13	26
7. Number of sequences containing no microsatellite	6	1	2	9
8. Number of primer pairs designed	11	4	11	26

Table 2 Microsatellite repeat motif in clones sequenced from microsatellite enriched library of *Jatropha* curcas L.

Microsatellite repeat motif	Number of clones	Percentage
Di-nucleotide repeat (47.06 %)		
$(CA)_n$	3	5.89
$(GA)_n$	16	31.37
$(GT)_n$	1	1.96
$(CT)_n$	4	7.84
Tri-nucleotide repeat (29.41 %)		
$(GGA)_n$	12	23.53
$(CCT)_n$	1	1.96
$(TCC)_n$	2	3.92
Compound repeat (23.53 %)		
$(CA)_n(GA)_n$	1	1.96
$(GT)_n(GA)_n$	1	1.96
$(CCT)_n(CT)_n$	2	3.92
$(GAA)_n(GGA)_n$	3	5.89
$(CAA)_n(CAG)_n$	2	3.92
$(CTT)_n(TTC)_n$	1	1.96
$(CCT)_n(CCA)_n$	2	3.92
Total	51	100

ไมโครแซทเทลไลท์ที่พบมากรองลงมาเป็นชนิดซ้ำ $(GGA)_n$ โดยพบ 23.53 % ของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด และพบลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ชนิด compound repeat ชนิดต่างๆ ในปริมาณใกล้เคียงกัน

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสบู่ดำ

คัดเลือกไพรเมอร์ 13 คู่ (Table 3) ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจากไพรเมอร์ทั้งหมดที่พัฒนา 26 คู่ มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำ 114 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่รวบรวมจากในประเทศไทย 82 ตัวอย่าง จาก 42 จังหวัด ได้แก่จังหวัด กาฬสินธุ์ มุกดาหาร สุรินทร์ อำนาจเจริญ นครศรีธรรมราช พัทลุง อุบลราชธานี นครราชสีมา ร้อยเอ็ด ปัตตานี เพชรบุรี จันทบุรี สุพรรณบุรี แพร่ ลำปาง สตูล ขอนแก่น ปทุมธานี ระยอง ชัยนาท พะเยา ประจวบคีรีขันธ์ เชียงใหม่ นครปฐม อุทัยธานี ปราจีนบุรี หนองคาย พิษณุโลก กาญจนบุรี กรุงเทพฯ เพชรบูรณ์ ยโสธร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุตรดิตถ์ น่าน ตาก ชุมพร สุราษฎร ธานี ตรัง กระบี่ และ นครสวรรค์ และตัวอย่างที่รวบรวมจากต่างประเทศ 32 ตัวอย่างจาก 10 ประเทศ ได้แก่ อินเดีย สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐประชาชนลาว ศรีลังกา สาธารณรัฐประชาชนจีน เขมร พม่า อินโดนีเซีย เปรู และ เม็กซิโก คู่ไพรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียว (monomorphism) ในสบู่ดำทุกตัวอย่าง ยกเว้นไพรเมอร์ 4 คู่ คือ JC USA_12, JC-Sbr3_37, JC NMR_147 และ NRM_221 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยมีจำนวน

Table 3 Characterization of microsatellite markers of *Jatropha curcas* L.

Locus/Marker	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	T_a (°C)	Expected size (base pair)
JC Sbr3_12	F: ACCACCTTTCAGAGCGGTAG	$(GGA)_7$	55	272
	R: TGACATTACCAAGTCCACGC			
JC Sbr3_61-1	F: AACTGACCGTTGCGTTTCTC	CAAAA and	55	230
	R: GATAATGACGATGGCAGCGA	$(CCT)_8(CCT)_4$		
JC Sbr3_61-2	F: TGGGTATGGATTTGATATTACC	$(CCT)_8(CCT)_4$	55	176
	R: GAGAAACGCAACGGTCAGTT			
JC Sbr3_69-1	F: GAGGCTGTGTTCCACCTATG	$(GA)_{20}$	57	167
	R: TCAGGCAGATGTCTTCACATG			
JC Sbr3_17	F: CGACCCATTTGATCAGTCCTA	$(CT)_{16}$	57	185
	R: CATGCATTGTGATCTTGTGGC			
JC Sbr3_34	F: CTTTCATACAGAATGTCCAAC	$(GA)_{11}$	55	215
	R: TTCTAGACGTCACTTGTAATCC			
JC Sbr3_35	F: CATCAGTGCCAATTTAGAAGT	$(CT)_{14}$	55	199
	R: CAGCCATCTTGAAGGTTAGC			
JC Sbr3_37*	F: GGCTCGATTTGGTTGCTGT	$(GA)_{21}$	53	133
	R: CGATCACGTCACAGTCGAA			
JC USA_12*	F: GTCTCCAAATGCAGATC	$(CAA)_{12}CAG$	55	208
	R: AGTAGCAGAAGCAGTAC			
JC NRM_22	F: CTTCTTCCTAGCAGAGATG	$(CA)_{10}(GA)_{23}$	51	153
	R: TGGTGTTTTAGATAGCACAC			
JC NRM_58	F: AGCCATCTTGAAGGTTAGC	$(GA)_{15}$	51	198
	R: CATCAGTGCCAATTTAGAAG			
JC NRM_147*	F: CACAATTCTCCAGATGGCTCC	$(GAA)_4(GGA)_{10}$	57	205
JC NMR_147	R: TGCAACCGCAATACACGACG			
JC NRM_221*	F: TGACACAGCAAGTGCACAAC	$(GT)_{10}(GA)_{22}$	55	234
JC NRM_221	R: TCACTATCCCTACTGCAGCT			

Note: The repeat and size of amplification product are based on sequenced clones from JC (*Jatropha curcas*) DNA library of Sbr3 (SS20-Sbr3), USA and NRM (Nakhon Ratchasima). Asterisk indicates polymorphic marker, T_a = annealing temperature.

แอลลีล 2 แอลลีล หรือ 2 ขนาดของแถบดีเอ็นเอ ต่อตำแหน่งหรือต่อคู่ไพรเมอร์ แต่ละตำแหน่งพบแอลลีลหนึ่งในกลุ่มตัวอย่างที่มีพิษ เช่น สบู่ดำเปรู 1 สบู่ดำเปรู 2 และ สบู่ดำ KUBP 16 และอีกแอลลีลหนึ่งพบในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีพิษจากเม็กซิโก เช่น สบู่ดำพิชัย สบู่ดำสุขสันต์ 1-4 สบู่ดำวิชาญ และ สบู่ดำสุขสันต์ ฉายรังสีแกมมา 10 Kr (Figure 1) โดยความเป็นพิษประเมินจากปริมาณสาร phorbal ester ในเมล็ด ถ้ามีปริมาณสารมากกว่า 0.01 % จัดเป็นพวกมีพิษ ถ้ามีปริมาณสารน้อยกว่า 0.01 % จัดเป็นพวกมีพิษน้อยหรือไม่มีพิษ สาร phorbal ester เป็นสารที่ทำให้เกิดความระคายเคือง เป็นสารเพิ่มฤทธิ์ของสารก่อมะเร็ง (ประโยชน์, 2549) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ไพรเมอร์ทั้ง

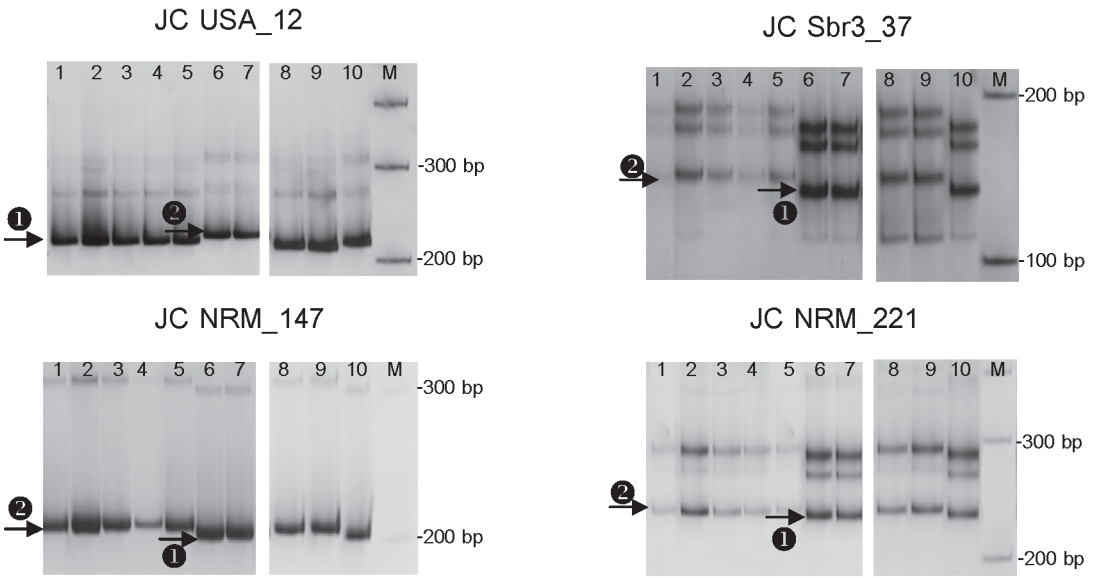

Figure 1 DNA fingerprints of 10 *Jatropha curcas* L. on 10% polyacrylamide gel based on 4 microsatellite markers (2 alleles from each marker).

1 = Pichai (nontoxic) 2 = Suksan 1 (nontoxic) 3 = Suksan 2 (nontoxic)
4 = Suksan 3 (nontoxic) 5 = Suksan 4 (nontoxic) 6 = Peru 1 (toxic)
7 = Peru 2 (toxic) 8 = Vicharn (nontoxic) 9 = Suksan 10kr (nontoxic)
10 = KUBP 16 (toxic) M: standard DNA marker (100 bp plus, Vivantis)

4 คู่ที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกลุ่มมีพิษและไม่มีพิษ อาจใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบ่งชี้พันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษได้ ซึ่งจะต้องตรวจสอบกับพันธุ์ทั้งมีพิษและไม่มีพิษตัวอย่างอื่นนอกจาก 114 ตัวอย่างที่มีอยู่ รวมทั้งวิเคราะห์ว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 ตำแหน่งเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษอย่างไรต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสบู่ดำโดยวิธี enrichment โดยใช้ไบโอตินโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ 4 ชนิด ได้แก่ B-$(GA)_{15}$, B-$(CA)_{15}$, B-$(ACC)_{10}$ และ B-$(CCT)_{10}$ ร่วมกับ magnetic beads ภายหลัง dot blot hybridization เลือกโคลนจำนวน 97 โคลน เพื่อนำไปหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับเบส ไมโครแซทเทลไลท์ 51 ลำดับเบส คิดเป็น 52.58 % โดยลำดับเบสซ้ำที่พบมากเป็นชนิด $(GA)_n$ 31.37 % และชนิด $(GGA)_n$ 23.53 % ออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 26 คู่ และได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจำนวน 13 คู่ มาตรวจสอบกับสบู่ดำทั้งหมด 114 ตัวอย่าง คู่ไพรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียวในสบู่ดำทุกตัวอย่าง ยกเว้นไพรเมอร์ 4 คู่ คือ JC USA_12, JC-Sbr3_37, JC NMR_147 และ NRM_221 โดยมีจำนวนแอลลีล 2 แอลลีล ต่อตำแหน่ง แต่ละตำแหน่งพบแอลลีลหนึ่งในกลุ่มตัวอย่างที่มีพิษ และอีกแอลลีลหนึ่งพบในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีพิษจากเม็กซิโก จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้แสดงให้เห็นว่า สบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่นี้อาจใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบ่งชี้พันธุ์ไม่มีพิษจากพันธุ์มีพิษได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้บางส่วนได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (MAG Window II) ปี 2550 ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา ปีงบประมาณ 2550 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนอุดหนุนวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2548-9 และ 2551

เอกสารอ้างอิง

ณัฏยา ศรีสวัสดิ์. 2545. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมะเขือเทศโดยการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นฤมล เข็มกลัดเงิน โชคชัย เอกทัศนาวรรณ และ วิภา หงษ์ตระกูล. 2547. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการตรวจสอบการปลอมปนของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม. ในรวบรวมผลงานโครงการที่ได้รับทุน IRPUS ประจำปี 2547, กรุงเทพฯ. น. 134-135.

ประโยชน์ ตันติเจริญยศ. 2549. ประโยชน์ด้านอื่นๆ ของต้นสบู่ดำ. *ในเอกสารวิชาการ:* ชำนาญ ฉัตรแก้ว และคณะ. *สบู่ดำ: พืชพลังงาน.* ฟันนี่พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. น. 93-99.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2537. สบู่ดำ พลังงานทดแทนทางเลือกใหม่แห่งอนาคต. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์เพชรกะรัต กรุงเทพฯ.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. สบู่ดำเพื่อไบโอดีเซล. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มติชน กรุงเทพฯ.

อรรัตน์ มงคลพร. 2543. การสร้าง microsatellite marker สำหรับพริก. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Areshchenkova, T. and Ganal, M.W. 2002. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. *Theor Appl Genet* 104: 229-235.

Ashworth, V.E.T.M., Kobayashi, M.C., Cruz, M.D. L. and Clegg, M.T. 2004. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of di-nucleotide and tri-nucleotide markers. *Sci Horticult* 101: 255-267.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

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

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

Gur-Arie, R., Cohen, C.J., Eitan, Y., Shelef, L., Hallerman, E.M. and Kashi, Y. 2000. Simple sequence repeat in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition and polymorphism. *Genome Res* 10: 62-71.

Lagercrantz, U., Ellegren, H. and Andersson, L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acid Res* 21: 1111-1115.

Levinson, G. and Gutman, G.A. 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tamdem repeats borne by bacteriophage M13 in *Echerichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 15: 5323-5338.

Morgante, M., Hanafer, M. and Powell, W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30: 194-200.

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

Panaud, O. and Chen, X.M. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSR) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet* 252: 597 -607.

Paniego, N., Echaide, M., Muooz, M., Fernllndez, L., Torales, S., Faccio, P., Fuxan, I., Carrera, M., Zandomeni, R., Sullrez, E.Y. and Hopp, H.E. 2001. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45: 34-43.

Richard, G.F. and Pâques, F. 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Rep* 1: 122-126.

Wang, Z., Weber, J.L., Zhong, G. and Tanksley, S.D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet* 88: 1-6.

Weber, J.L. and May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms with can be types using polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388-396.