Thai J. Genet. 2015, 8(1) : 26–37 DOI 10.14456/tjg.2015.5

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางการเกษตร และเครื่องหมายดีเอ็นเอ

Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) based on morpho-agronomic characters and DNA markers

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร[1,3] ประภา ศรีพิจิตต์[1]* วิภา หงษ์ตระกูล[2] รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ[1]

Sirisak Soontornyatara[1,3], Prapa Sripichitt[1]*, Vipa Hongtrakul[2], Rugsarid Kaveeta[1]

[1]*ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900*

[2]*ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900*

[3]*สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี กาญจนบุรี 71150*

[1]*Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*

[2]*Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*

[3]*Division of Agricultural Science, Mahidol University, Kanchanaburi Campus, Kanchanaburi 71150, Thailand*

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

บทคัดย่อ

จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) จำนวน 128 accession ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ทั้งภายในและต่างประเทศโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะทางการเกษตร และลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP พบว่า สบู่ดำทั้งหมดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมากเมื่อประเมินโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ส่วนการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมในลักษณะทางการเกษตรของสบู่ดำ พบว่าบางลักษณะมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ในขณะที่บางลักษณะมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำ การจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ กล่าวคือสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำส่วนใหญ่จำนวน 127 accession ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสบู่ดำเพียง 1 accession แต่มิใช่ accession เดียวกันโดยเป็นสบู่ดำ J23 ที่ใบและผลอ่อนมีสีเขียวสลับขาวในการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเป็นสบู่ดำ J7 จากสหรัฐอเมริกาที่ใบและผลอ่อนมีสีเขียวปกติในการจัดกลุ่มโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักเพื่อการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางการเกษตรพบว่าไม่สามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักโดยอาศัยลักษณะทางการเกษตรสามารถแยกสบู่ดำบาง accession ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่เฉพาะและโดดเด่นออกมาจากสบู่ดำส่วนใหญ่ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน ซึ่งช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกสบู่ดำเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาพันธุ์สบู่ดำให้มีลักษณะตามที่ต้องการต่อไป

ABSTRACT

Genetic diversity and cluster analysis of 128 accessions of physic nut (*Jatropha curcas* L.) collected from various sources in Thailand and other countries were analyzed and compared using morphological characters, agronomic characters and DNA fingerprints developed by AFLP markers. The results revealed that all accessions of physic nut showed very low genetic diversity when evaluated by morphological characters and DNA fingerprints. Genetic variation was also assessed using agronomic

characters. It was found that some agronomic characters showed high genetic variation whereas others exhibited low genetic variation. Cluster analysis of 128 accessions of physic nut using morphological characters was in accordance with that using DNA fingerprints. Physic nut was clustered into two groups; the first group consisted of 127 accessions while the second group comprised only one accession. However, the one accession was not the same when analyzed by different method. It was accession J23 with variegated leaves and young fruit in cluster analysis using morphological characters whilst it was J7 from USA having normal green leaves and young fruits in cluster analysis using DNA fingerprints. Principal component analysis (PCA) for clustering using agronomic characters could not classify physic nut into distinct groups following the cluster analysis using morphological characters and DNA fingerprints. However, PCA using agronomic characters could differentiate some accessions with specific and distinct characters. These accessions might be selected and used as germplasm for further improvement of physic nut with desirable characters.

คำสำคัญ: สบู่ดำ; ความหลากหลายทางพันธุกรรม; การวิเคราะห์การจัดกลุ่ม; ลักษณะทางการเกษตร; เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Keywords: physic nut; genetic diversity; cluster analysis; agronomic characters; DNA marker

บทนำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชน้ำมันที่มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันจากฟอสซิสที่มีปริมาณลดลงเรื่อยๆ โดยจะหมดไปภายใน 40–50 ปีข้างหน้า ทั้งนี้เนื่องจากสบู่ดำมีปริมาณน้ำมันค่อนข้างสูงประมาณ 46–58 % ของเนื้อในเมล็ด (kernel) (Subramanian *et al*., 2005) และน้ำมันที่สกัดได้จากสบู่ดำสามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลในเครื่องยนต์การเกษตรได้ถึง 100 % โดยไม่ต้องใช้น้ำมันอื่นผสม (ระพีพันธุ์ และสุขสันต์, 2525) อย่างไรก็ตามการปลูกสบู่ดำในประเทศไทยนั้นเกษตรกรยังขาดแคลนพันธุ์สบู่ดำที่สามารถให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันที่สูง ดังนั้นการรวบรวมพันธุ์สบู่ดำจากแหล่งต่างๆ เพื่อนำมาศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในลักษณะต่างๆ และจัดจำแนกสบู่ดำออกเป็นกลุ่ม จะทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถใช้ข้อมูลการจัดกลุ่มและพันธุ์สบู่ดำที่รวบรวมได้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการคัดเลือก และพัฒนาพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตและปริมาณน้ำมันที่สูงเหมาะสมสำหรับใช้เป็นพันธุ์แนะนำให้เกษตรกรปลูกต่อไป

สบู่ดำเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae มีแหล่งกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ เช่น ประเทศนิคารากัว และกระจายพันธุ์ไปยังประเทศเม็กซิโก ต่อมาชาวโปรตุเกสได้นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา ส่วนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ดังนั้น การจัดกลุ่มสบู่ดำจะเป็นประโยชน์ต่อการตัดสินใจในการเลือกพันธุ์สบู่ดำไปปลูกและสะดวกที่นักปรับปรุงพันธุ์จะเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการสร้างลูกผสมต่อไป เช่น ในปี 2550 ศิริศักดิ์และคณะได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศจำนวน 134 accession และพืชที่ใช้เป็น outgroup 4 ชนิด (species) โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP (amplified fragment length polymorphism) และจัดกลุ่มสบู่ดำและพืช outgroup โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมและแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ dendrogram พบว่า สามารถจัดแบ่งสบู่ดำและพืช outgroup ออกเป็น 6 กลุ่มซึ่งประกอบด้วยพืช outgroup 4 กลุ่ม และสบู่ดำ 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นสบู่ดำจากแหล่งต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ และกลุ่มที่ 2 เป็นสบู่ดำจากสหรัฐอเมริกา ต่อมาในปี 2551 พัชรินทร์และคณะได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจำนวน 34 accession จากประเทศไทย อินเดีย จีน และเวียดนาม โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย RAPD (random amplified polymorphism DNA) และจัดกลุ่มสบู่ดำโดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient พบว่าสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไทยกับอินเดีย และกลุ่มจีนกับเวียดนาม ในปี 2011 Tanya *et al*.

ได้ประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*J. curcas*) จำนวน 30 accession สบู่แดง (*J. gossypifolia*) เข็มปัตตาเวีย (*J. intergerrima*) หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) ลูกผสมโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย ISSR (inter simple sequence repeat) และสามารถจัดแบ่งพืชเหล่านี้ออกเป็น 7 กลุ่ม โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำจากประเทศเม็กซิโก กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสบู่ดำจากจีนและเวียดนาม กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสบู่ดำจากไทย กลุ่มที่ 4 เป็นเข็มปัตตาเวีย กลุ่มที่ 5 เป็นสบู่แดง กลุ่มที่ 6 เป็นหนุมานนั่งแท่น และกลุ่มที่ 7 เป็นละหุ่งลูกผสมที่เด่นชัดที่สุด ต่อมาศิริศักดิ์ และคณะ (2555) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจำนวน 128 accession โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตร พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายต่ำในลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำส่วนใหญ่จำนวน 127 accession ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสบู่ดำเพียง 1 accession เท่านั้น และจากการศึกษาความผันแปรในลักษณะทางการเกษตรของสบู่ดำ พบว่าอัตราส่วนระหว่างดอกตัวเมียและดอกตัวผู้เป็นลักษณะที่มีความแปรปรวนมากที่สุด ในขณะที่จำนวนพูต่อผลเป็นลักษณะที่มีความแปรปรวนน้อยที่สุด เมื่อนำข้อมูลลักษณะทางการเกษตรไปวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principle component analysis: PCA) เพื่อการจัดกลุ่ม พบว่าไม่สามารถแบ่งกลุ่มสบู่ดำได้อย่างชัดเจน แต่มีสบู่ดำบาง accession ที่แยกตัวออกมาอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากมีลักษณะทางการเกษตรที่เฉพาะตัว ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มสบู่ดำที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ทั้งภายในและต่างประเทศโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางการเกษตร (ศิริศักดิ์ และคณะ, 2555) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP (ศิริศักดิ์ และคณะ, 2550) ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกพันธุ์และการผสมพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตเพิ่มมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

สบู่ดำจำนวน 128 accession ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ทั้งในประเทศและจากประเทศอื่นอีก 6 ประเทศ (Table 1) เริ่มเก็บข้อมูลเมื่อสบู่ดำมีอายุ 14 เดือน โดยใช้เวลาเก็บข้อมูลเป็นเวลา 6 เดือน (พฤษภาคม–ตุลาคม 2551)

การปลูกสบู่ดำ

คัดเลือกกิ่งสบู่ดำที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ตัดเป็นท่อนยาว 20–25 เซนติเมตร นำไปปักชำในดินผสมซึ่งบรรจุอยู่ในถุงพลาสติกสีดำ เพื่อให้ตาจากกิ่งงอกเป็นต้นกล้า จากนั้นนำต้นกล้าสบู่ดำอายุประมาณ 45-60 วันหลังการปักชำไปปลูกในแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ จ. นครราชสีมา วางแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized complete block design) ทำ 3 ซ้ำ ระยะระหว่างแถว 3 เมตร ระยะระหว่างต้น 1.5 เมตร แต่ละ accession ปลูก 1 แถว แถวละ 5 ต้น

Table 1 Number of accessions , accession number and origin of physic nut used in the experiment.

No. of accessions	Accession no.	Country
115	J2-J5, J8-J13, J15-J27, J29-J35, J37, J40, J41, J42, J44-J47, J49, J52-J54, J56-J60, J63-J129, J132	Thailand
2	J7, J38	USA
1	J55	China
6	J6, J28, J36, J39, J48, J51	India
1	J130	Suriname
2	J50, J131	Sri Lanka
1	J14	Laos

Accessions source: National Corn and Sorgham Research Center

การปลูกสบู่ดำ

คัดเลือกกิ่งสบู่ดำที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ตัดเป็นท่อนยาว 20–25 เซนติเมตร นำไปปักชำในดินผสมซึ่งบรรจุอยู่ในถุงพลาสติกสีดำ เพื่อให้ตาจากกิ่งงอกเป็นต้นกล้า จากนั้นนำต้นกล้าสบู่ดำอายุประมาณ 45-60 วันหลังการปักชำไปปลูกในแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ จ. นครราชสีมา วางแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized complete block design) ทำ 3 ซ้ำ ระยะระหว่างแถว 3 เมตร ระยะระหว่างต้น 1.5 เมตร แต่ละ accession ปลูก 1 แถว แถวละ 5 ต้น

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตรของสบู่ดำ

เริ่มบันทึกข้อมูลเมื่อต้นสบู่ดำมีอายุ 14 เดือน และเก็บผลผลิตต่ออีก 6 เดือน โดยบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตรของสบู่ดำจำนวน 3 ต้นที่อยู่ตรงกลางแถวจากทั้งหมด 5 ต้นของแต่ละ accession โดยบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยารวม 8 ลักษณะ ได้แก่ สีใบ รูปร่างใบ จำนวนรอยหยัก รูปทรงช่อดอก รูปร่างผล สีผล รูปร่างเมล็ด สีเปลือกหุ้มเมล็ด และบันทึกลักษณะทางการเกษตรรวม 23 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวก้านใบ ความสูงต้น อัตราส่วนระหว่างส่วนดอกตัวเมียและดอกตัวผู้ ความยาวผล ความกว้างผล ความยาวเมล็ด ความกว้างเมล็ด ความหนาเมล็ด น้ำหนักเมล็ดต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด และผลผลิตเมล็ด (น้ำหนักเมล็ดรวม) ที่ความชื้น 15 %

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางการเกษตร

นำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่บันทึกได้ไปหาค่าเฉลี่ย (mean) ของแต่ละ accession เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYS) -PC เวอร์ชั่น 2.20 (Rohlf, 2005) เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของสบู่ดำทั้ง 128 accession โดยวิธี Simple matching coefficient (Sokal and Sneath, 1963) และวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) ด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) ส่วนการวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางการเกษตรทำโดยการหาค่าเฉลี่ย และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ของแต่ละลักษณะโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT (international rice research institute statistics) และจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม NTSYS-PC เวอร์ชั่น 2.20 วิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principle component analysis: PCA) โดยแสดงผลในรูปแบบกราฟสองมิติ

การสกัดดีเอ็นเอจากสบู่ดำ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนสบู่ดำที่ปลูกในแปลงทดลองหลังการปักชำเมื่ออายุ 14 เดือนโดยใช้ CTAB ตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) และตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง lamda UV/VIS spectrophotometer และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำด้วยเครื่องหมาย AFLP

สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยการย่อยดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI (G/AATTC) และ *Mse*I (T/TAA) ตามวิธีการของ Vos *et al*. (1995) และใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ที่คัดเลือกจากไพรเมอร์ 60 คู่ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ *Eco*RI primer และ *Mse*I primer ที่เพิ่มเบสที่ช่วยในการคัดเลือก 1 ตัวที่ปลาย 3´ คือ primer E+1ได้แก่ E-A และ E-C และ primer M+1 ได้แก่ M-C และ M-A และselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ *Eco*RI primer และ *Mse*I primer ที่เพิ่มเบสที่ช่วยในการคัดเลือก 3 ตัวที่ปลาย 3´ คือ Primer E+3 ได้แก่ E-AAC, E-AAG, E-ACA, E-ACC, E-ACG, E-ACT, E-AGC, E-AGG, E-CAA, E-CAC, E-CAG และ Primer M+3 ได้แก่ M-CAA, M-CAC, M- CAG, M-CAT, M-CTA, M-CTC, M-CTG, M-CTT, M-AGA, M-ATA, M-AAG, M-ACG, M-AGG และ M-AAT และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นโดยเทคนิค AFLP

บันทึกข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่พบแถบดีเอ็นเอด้วย “1” และไม่พบแถบดีเอ็นเอด้วย “0” นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.20 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสบู่ดำแต่ละ accession และสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และคำนวณค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (genetic similarity) โดยใช้วิธี simple-matching (Sokal and Sneath, 1963)

ผลการทดลอง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำทั้ง 128 accession โดยอาศัยข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.75–1.00 ซึ่งจัดว่ามีค่าสูงมาก หรือสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมากในลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจากการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม (Table 2) คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำส่วนใหญ่จำนวน 127 accession สบู่ดำในกลุ่มมีใบสีเขียว รูปโล่ และมีรอยหยัก 5 หยัก ช่อดอกเป็นแบบ compound dichasia ผลอ่อนมีสีเขียวและมีรูปร่างค่อนข้างกลม เมล็ดมีสีดำและมีรูปร่างแบนรี ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสบู่ดำเพียง accession เดียว คือ J23 ซึ่งมีลักษณะใบและผลด่าง มีสีเขียวสลับขาว ส่วนลักษณะอื่นๆ ไม่แตกต่างจากสบู่ดำกลุ่มที่ 1

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางการเกษตร

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ในลักษณะทางการเกษตร 23 ลักษณะของสบู่ดำทั้ง 128 accession พบว่าลักษณะที่มีความแปรปรวนสูงที่สุด 3 อันดับแรกได้แก่ อัตราส่วนระหว่างดอกตัวเมียและดอกตัวผู้ (CV = 35.29%) น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (CV = 34.60%) และจำนวนดอกตัวเมียต่อช่อ (CV = 32.55%) แสดงว่าลักษณะทั้งสามมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ส่วนลักษณะที่มีความแปรปรวนต่ำที่สุด 3 อันดับ ได้แก่ จำนวนพูต่อผล (CV = 1.36%) ความกว้างเมล็ด (CV = 2.73%) และความหนาเมล็ด (CV = 3.60%) แสดงว่าลักษณะทั้งสามนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักหรือ PCA เพื่อจัดกลุ่มสบู่ดำ และแสดงผลโดยการเขียนเป็นกราฟสองมิติ พบว่าไม่สามารถจำแนกสบู่ดำออกเป็นกลุ่มได้ (Figure 1) แต่จากกราฟสองมิติ พบว่า สบู่ดำบาง accession มีการแยกตัวออกจาก accession อื่นๆ อย่างชัดเจน โดยมีลักษณะทางการเกษตรที่เฉพาะบางอย่าง เช่น สบู่ดำ J54 มีลักษณะออกดอกเร็วกว่า accession อื่นๆ สบู่ดำ J22 มีลักษณะต้นเตี้ยและทรงพุ่มแคบ ใบและก้านใบสั้น จำนวนช่อผลต่อต้นและจำนวนผลต่อต้นต่ำมาก สบู่ดำ J23 มีลักษณะต้นเตี้ย และทรงพุ่มแคบที่สุด ใบและก้านใบสั้นที่สุด ใบด่างมีสีเขียวสลับขาว จำนวนช่อผลต่อต้น และจำนวนผลต่อต้นต่ำที่สุด นอกจากนี้ผลอ่อนมีสีเขียวสลับขาว สบู่ดำ J31 และ J49 มีลักษณะต้นเตี้ย จำนวนช่อดอกค่อนข้างสูง และมีอายุวันออกดอกยาว สบู่ดำ J96 มีจำนวนช่อผลต่อต้น และจำนวนผลต่อต้นมากที่สุด และสบู่ดำ J117 เป็น accession ที่มีลักษณะโดดเด่นที่สุด เนื่องจากมีจำนวนเมล็ดต่อต้นมากที่สุด (75.38 เมล็ดต่อต้น) มีจำนวนพูต่อผลมากที่สุด บางผลมี 4 พู ในขณะที่สบู่ดำส่วนใหญ่มี 3 พู (ทั้งสองลักษณะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง) และผลผลิตเมล็ดสูงที่สุด (40.26 กิโลกรัมต่อไร่) (Figure 1)

Table 2 Cluster analysis of 128 accessions of physic nut based on morphological characters.

Cluster	Accession no.	Country	Characters
1	J2 - J22, J24-J42, J44-J60, J63-J132 (127 accessions)	USA, India, China, Laos, Sri Lanka, Suriname, Thailand	Green leaves and fruits
2	J23	Thailand	Green-white leaves and fruits

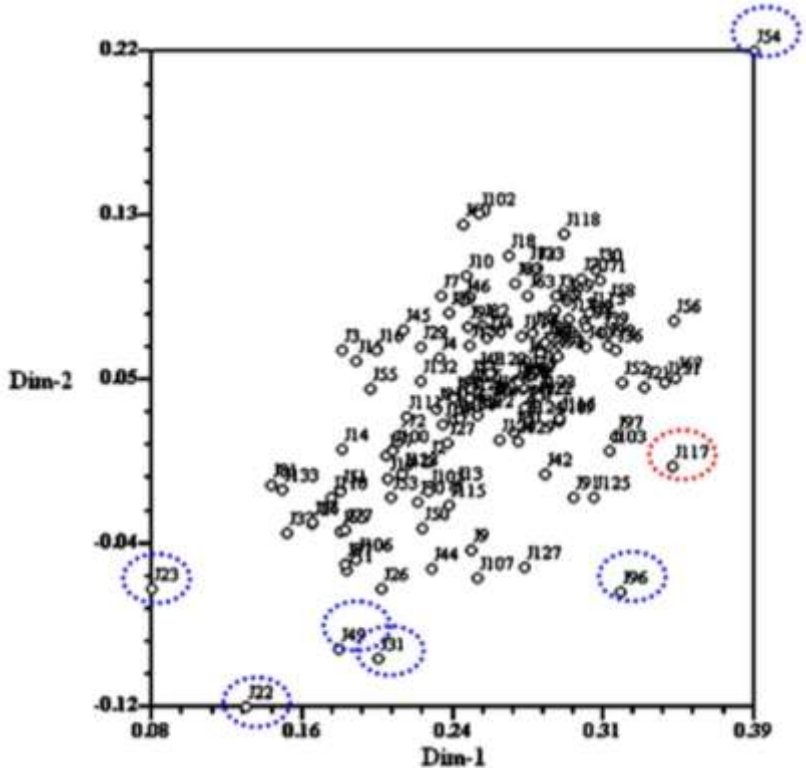

Figure 1 Distribution pattern of 128 accessions of physic nut identified by principal component analysis, 6 special character accessions (blue circles) and a high yield accession (red circle).

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำด้วยเครื่องหมาย AFLP

จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำ 128 accession โดยใช้เครื่องหมาย AFLP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ (Figure 2) มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 680 แถบโดยมีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic band) ระหว่างสบู่ดำจำนวน 58 แถบ คิดเป็น 8.53 % ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด โดยแบ่งออกเป็นแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะสบู่ดำเกือบทั้งหมด (127 accession) จำนวน 54 แถบ (Table 3) และแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะกับสบู่ดำ J7 (จากสหรัฐอเมริกา) จำนวน 4 แถบ

ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP

เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสบู่ดำที่ได้จากเครื่องหมาย AFLP มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำจำนวน 128 accession พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.84 ถึง 1.00 ค่าเฉลี่ย 0.995 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสบู่ดำทั้ง 128 accession มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมหรือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ

การจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP

เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่มและสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA พบว่า สามารถจัดจำแนกสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม (Figure 3) โดยสบู่ดำเกือบทั้งหมด 127 accession จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ส่วนสบู่ดำ J7 จากสหรัฐอเมริกาที่มีพันธุกรรมแตกต่างจากสบู่ดำ accession อื่นๆ จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 จากการจัดกลุ่มแสดงให้เห็นว่าสบู่ดำส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม ยกเว้นสบู่ดำ J7 ที่มีพันธุกรรมแตกต่างจนแยกออกมาอีกกลุ่มหนึ่ง

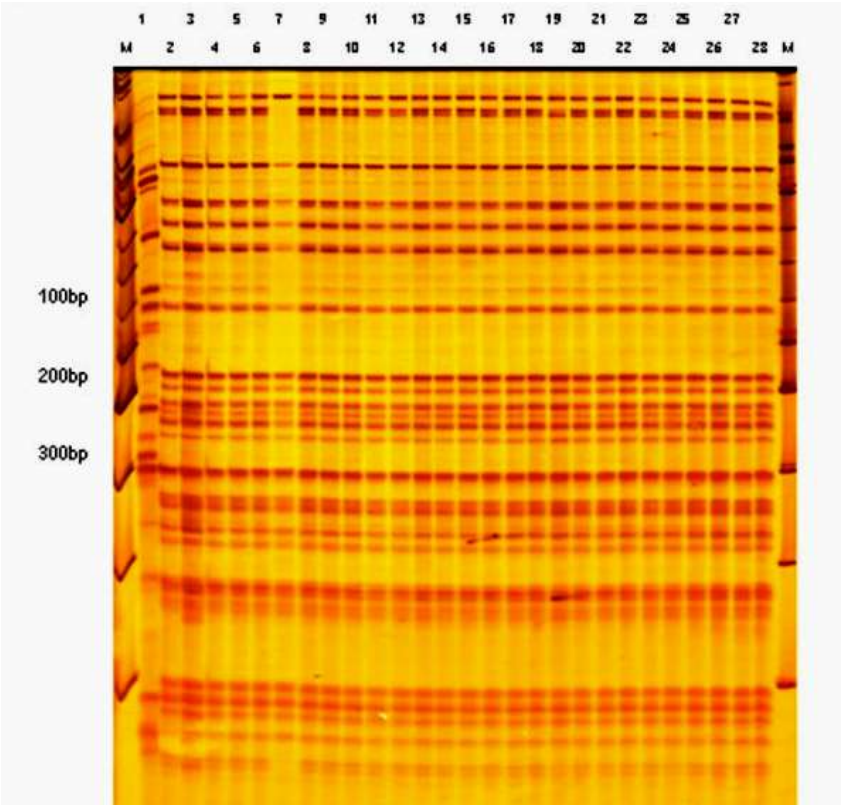

Figure 2 DNA fingerprint of physic nut, J1-J28 samples, developed by AFLP markers.

Table 3 Number of AFLP bands specific to 128 accessions of physic nut.

Cluster	Accession no.	Country	AFLP specific bands
1	J2-J6, J8-J42, J44-J60, J63-J128	Thailand, USA, India, China Sri Lanka, Suriname, Laos	54
2	J7	USA	4

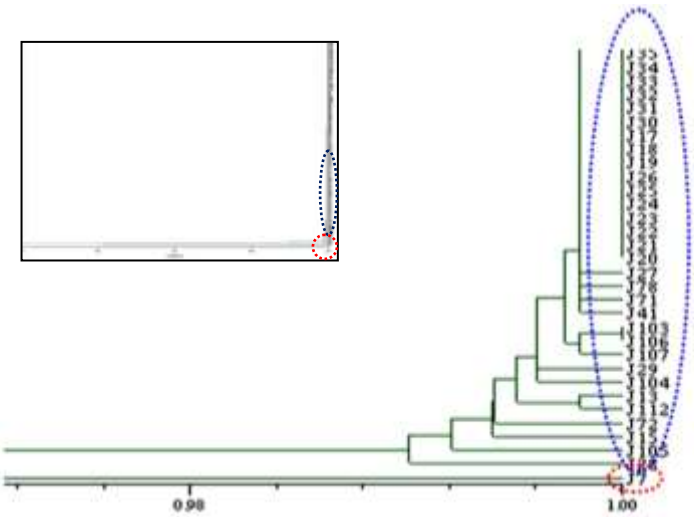

Figure 3 UPGMA clustering of 128 accessions of physic nut based on AFLP markers and 2 identified groups (blue and green groups).

การเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมและผลการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางการเกษตร และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ 128 accession โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตร พบว่า สบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมากในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนลักษณะทางการเกษตรบางลักษณะมีความผันแปรทางพันธุกรรมต่ำ เมื่อเปรียบเทียบผลการจัดกลุ่มสบู่ดำ 128 accession โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตร พบว่า การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน ในขณะที่การใช้ลักษณะทางการเกษตรไม่สามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็นกลุ่มอย่างชัดเจนได้ และจากผลการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ากลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำจำนวนมากถึง 127 accession ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ แต่ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักโดยอาศัยข้อมูลลักษณะทางการเกษตรพบว่าสบู่ดำในกลุ่มดังกล่าวมีการกระจายตัวแยกออกจากกันเนื่องจากมีลักษณะทางการเกษตรที่แตกต่างกัน (Figure 1) การจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรอาจให้ผลที่สอดคล้องหรือไม่สอดคล้องกันก็ได้ เช่น ผลจากการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรของสบู่ดำ J23 มีความสอดคล้องกัน เนื่องจากสบู่ดำ accession นี้มีความแตกต่างจาก accession อื่นๆ อย่างชัดเจนทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตร จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าสบู่ดำ J23 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 มีสีของใบและผลอ่อนต่างจาก accession อื่น ๆ ส่วนลักษณะทางการเกษตรของสบู่ดำ accession นี้มีลักษณะที่เฉพาะหลายอย่าง ได้แก่ จำนวนช่อผลต่อต้น จำนวนผลต่อต้น และน้ำหนักเมล็ดต่อต้นน้อยที่สุด ส่วนความกว้างใบและความยาวก้านใบค่อนข้างน้อยกว่า accession อื่น แต่ผลการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตรของสบู่ดำ accession อื่นๆ อาจไม่สอดคล้องกันเนื่องจากบาง accession มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่แตกต่างจาก accession อื่น แต่อาจมีลักษณะทางการเกษตรที่เป็นเอกลักษณ์ เช่น ผลการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสบู่ดำ J54 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ร่วมกับสบู่ดำอีก 127 accession เนื่องจากสบู่ดำ J54 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างจาก accession อื่นๆ แต่มีลักษณะทางการเกษตรคือ อายุวันออกดอกที่แตกต่างจาก accession อื่นๆ อย่างชัดเจน สบู่ดำอีก accession หนึ่งคือ J117 ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 เช่นเดียวกันเมื่อจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ถ้าพิจารณาจากลักษณะทางการเกษตร พบว่า accession นี้มีลักษณะทางเกษตรซึ่งเป็นองค์ประกอบของผลผลิตที่ดีเด่นกว่า accession อื่นอย่างเห็นได้ชัด จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ 128 accession โดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมาย AFLP พบว่า สบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำมากในลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลการจัดกลุ่มสบู่ดำ 128 accession โดยอาศัยเครื่องหมาย AFLP พบว่า สามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่มซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำจำนวน 127 accession ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสบู่ดำจำนวน 1 accession ที่แตกต่างกัน โดยเป็นสบู่ดำ J27 ที่มีใบและผลด่างในการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่เป็นสบู่ดำ J7 จากสหรัฐอเมริกาในการจัดกลุ่มโดยอาศัยเทคนิค AFLP ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยใช้เครื่องหมาย AFLP ไม่สอดคล้องความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางการเกษตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตร

จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนมีเพียงลักษณะใบและผลด่างที่มีสีเขียวสลับขาวซึ่ง

พบในสบู่ดำเพียง accession เดียวเท่านั้น คือ J23 และจากการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยสบู่ดำส่วนใหญ่จำนวน 127 accession ส่วนกลุ่มที่สองประกอบด้วยสบู่ดำเพียง accession เดียว คือ J23 ซึ่งสอดคล้องกับ พีระศักดิ์ (2555) ที่กล่าวว่าเชื้อพันธุกรรมของสบู่ดำที่พบโดยทั่วไปมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และยังมีคุณสมบัติของพันธุ์ป่าอยู่มาก จากการศึกษาความแปรปรวนในลักษณะทางการเกษตรของสบู่ดำจำนวน 23 ลักษณะ พบว่าลักษณะที่มีความแปรปรวนสูงที่สุด 3 อันดับแรก คือ อัตราส่วนระหว่างดอกตัวเมียและดอกตัวผู้ น้ำหนักเมล็ดต่อต้น และจำนวนดอกตัวเมียต่อช่อ ส่วนลักษณะที่มีความแปรปรวนต่ำสุด 3 อันดับแรก คือ จำนวนพูต่อผล ความกว้างเมล็ด และความหนาเมล็ด ลักษณะทางการเกษตรส่วนใหญ่เป็นลักษณะทางปริมาณซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมากและสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน ทำให้ลักษณะที่แสดงออกมีความแปรปรวนสูง (Acquaah, 2007) โดยเฉพาะอย่างยิ่งอัตราส่วนระหว่างดอกตัวเมียและดอกตัวผู้เป็นลักษณะที่มีความแปรปรวนสูงที่สุดโดยผันแปรอยู่ระหว่าง 1:14 ถึง 1:91 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Prakash *et al.* (2007) ที่รายงานว่าอัตราส่วนของดอกตัวเมียต่อดอกตัวผู้ของสบู่ดำมีความแปรปรวนสูง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1:20 แต่ในสภาพอากาศที่เย็น พบว่าอัตราส่วนระหว่างดอกเมียและดอกตัวผู้มีการเปลี่ยนแปลงและแปรปรวนเป็นอย่างมาก บางต้นมีอัตราส่วนของดอกตัวเมียต่อตัวผู้เท่ากับ 1:108 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) เพื่อจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางการเกษตร พบว่าไม่สามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็นกลุ่ม ในขณะที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะทางการเกษตรส่วนใหญ่ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก สภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน ทำให้ลักษณะที่แสดงออกมีความผันแปรอย่างต่อเนื่อง (continuous variation) ไม่สามารถแยกออกจากกันเป็นกลุ่มอย่างชัดเจน (discrete variation) เหมือนลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งส่วนใหญ่เป็นลักษณะทางคุณภาพ (qualitative trait) ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนน้อย และสภาพแวดล้อมไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะ (Acquaah, 2007) เช่น สบู่ดำ J23 ที่มีลักษณะใบและผลอ่อนด่าง (สีเขียวสลับขาว) ซึ่งจัดว่าเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสบู่ดำ accession นี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 โดยมีลักษณะที่แตกต่างจากสบู่ดำในกลุ่มที่ 1 อย่างเห็นได้ชัดซึ่งมีใบและผลอ่อนสีเขียวปกติ จึงถูกจัดแยกออกมาเป็นสบู่ดำอีกกลุ่มหนึ่ง อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักโดยอาศัยลักษณะทางการเกษตร สามารถแยกสบู่ดำบาง accession ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีลักษณะที่เฉพาะหรือโดดเด่นออกมาได้ เช่น สบู่ดำ J54 ที่มีอายุวันออกดอกสั้นกว่าสบู่ดำ accession อื่น สบู่ดำ J117 ที่ให้ผลผลิตเมล็ดสูงที่สุด สบู่ดำที่มีลักษณะทางการเกษตรที่โดดเด่นเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อพันธุกรรม (germplasm) ในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำต่อไป

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP

จากการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยหลายเรื่องที่ พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ เช่น การทดลองของ Pamidiamarri *et al.* (2010) ที่ได้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศอินเดียจำนวน 28 ตัวอย่าง โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP และ RAPD พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของสบู่ดำมีค่าสูงอยู่ระหว่าง 0.8–1.00 ซึ่งค่าที่ได้นี้ใกล้เคียงกับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของสบู่ดำในการทดลองนี้ซึ่งอยู่ระหว่าง 0.84 – 1.00 และจากงานวิจัยของ Shen *et al.* (2010) ซึ่งได้ใช้เครื่องหมาย AFLP ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในมณฑลไห่หนาน ประเทศจีน พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำเช่นเดียว กัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของสบู่ดำอยู่ระหว่าง 0.87–0.98 นอกจากนี้ Tanya *et al.* (2011) ได้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำจากประเทศเม็กซิโก จีน ไทย และเวียดนาม รวม 30 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมาย ISSR ก็

พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำเช่นเดียวกัน

จากการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมจากเครื่องหมาย AFLP พบว่า สามารถจัดจำแนกสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำจำนวน 127 accession ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสบู่ดำเพียงหนึ่ง accession เท่านั้น คือ J7 ซึ่งเป็นสบู่ดำจากสหรัฐอเมริกา ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มสบู่ดำจำนวน 42 accession จากพื้นที่ปลูกต่างๆ ในประเทศอินเดียร่วมกับสบู่ดำพันธุ์ที่ไม่มีพิษ (non-toxic genotype) จากประเทศเม็กซิโก โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมจากเครื่องหมาย ISSR ซึ่งพบว่าสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยสบู่ดำ 42 accession จากอินเดีย ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นสบู่ดำจากเม็กซิโก (Basha and Sujatha, 2007) ในทำนองเดียวกันพัชรินทร์ และคณะ (2551) ได้จัดกลุ่มสบู่ดำ 34 accession จากประเทศไทย อินเดีย จีน และเวียดนาม โดยอาศัยค่า Dice's similarity coefficient จากเครื่องหมาย RAPD พบว่าสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไทยกับอินเดีย และกลุ่มจีนกับเวียดนาม จึงเห็นได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ เช่น AFLP, ISSR, และ RAPD สามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกได้เพียง 2 กลุ่มใหญ่เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องมาจากสบู่ดำที่ใช้ในการศึกษามีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูง หากต้องการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมให้กับสบู่ดำจำเป็นต้องใช้วิธีการอื่นเข้าช่วย เช่น การผสมข้ามพืชต่างชนิด/สกุล (wide hybridization) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation induction) หรือการถ่ายทอดยีนให้กับสบู่ดำโดยตรง (direct gene transfer)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางการเกษตร และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับการประเมินโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP ที่พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมากเช่นเดียวกัน ส่วนการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในลักษณะทางการเกษตรของสบู่ดำ พบว่าบางลักษณะมีความแปรปรวนสูง เช่น อัตราส่วนระหว่างดอกตัวเมียและดอกตัวผู้ น้ำหนักเมล็ดต่อต้น และจำนวนดอกตัวเมียต่อช่อ ในขณะที่บางลักษณะ เช่น จำนวนพูต่อผล ความกว้างเมล็ด และความหนาเมล็ดมีความแปรปรวนต่ำ

จากการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า สามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำส่วนใหญ่จำนวน 127 accession ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสบู่ดำเพียง accession เดียว คือ J23 ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มสบู่ดำโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย AFLP ที่พบว่าสามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกัน โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำส่วนใหญ่จำนวน 127 accession ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสบู่ดำเพียง accession เดียว คือ J7 ซึ่งเป็นสบู่ดำจากสหรัฐอเมริกา ทั้งนี้สบู่ดำ J7 นั้นถูกจัดแบ่งอยู่ในกลุ่มที่ 1 ของการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สบู่ดำในกลุ่มนี้มีใบและผลอ่อนสีเขียว แต่ใบและผลอ่อนของสบู่ดำ J23 มีสีเขียวสลับขาว ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ของการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอไม่สามารถจัดแบ่งสบู่ดำ J23 ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากสบู่ดำ accession อื่นอย่างเห็นชัดออกเป็นสบู่ดำอีกกลุ่มหนึ่งได้นั้น อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากลักษณะใบและผลอ่อน (มีสีเขียวสลับขาว) ต่างของสบู่ดำ J23 เกิดจากความผิดปกติของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) (Caldwell and Teagarden, 2010) แต่ในการทดลองนี้ไม่ได้เน้นการตรวจสอบดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบยีนเป้าหมายที่ควบคุมลักษณะใบและผลต่างของสบู่ดำ J23 ได้ จึงไม่อาจแยกสบู่ดำ J23 ออกมาได้ ส่วน accession ที่มาจากสหรัฐอเมริกามี 2 accession คือ J7 และ J38 เมื่อจำแนกกลุ่มแล้วอยู่คนละกลุ่ม ทั้งนี้คาดว่าน่าจะมาจากแหล่งที่ต่างกันเพราะแถบดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่ง J38 จะอยู่กลุ่มเดียวกับ J2-J6, J8-J28 (Figure 2), J29-J37, J39-J42, J44-J60 และ J63-J128 (Table 3)

ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักเพื่อการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางการเกษตร พบว่าไม่สามารถจัดแบ่งสบู่ดำออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกับการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักโดยอาศัยลักษณะทางการเกษตรสามารถแยกสบู่ดำบาง accession ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่เฉพาะและโดดเด่นออกมาจากสบู่ดำส่วนใหญ่ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน ซึ่งช่วยทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกสบู่ดำเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาพันธุ์สบู่ดำให้มีลักษณะตามที่ต้องการต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณคุณแอนนา สายมณีรัตน์ ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อพันธุกรรมสบู่ดำ

เอกสารอ้างอิง

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ (2555) วิจัยสบู่ดำพันธุ์ใหม่เพิ่มน้ำมันเป็น 2 เท่า. E-cite Thaipost, http://www.thaipost.net/x-cite/ (17 มกราคม 2555).

พัชรินทร์ ตัญญะ สนธิชัย จันทร์เปรม สมบัติ ชิณะวงศ์ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ (2551) ความหลากหลายทางพันธุกรรม ของสายพันธุ์สบู่ดำในเอเชียจากการประเมินโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD. ว วิชาการเกษตร 26: 36–47.

ระพีพันธุ์ ภาสบุตร สุขสันต์ สุทธิผลไพบูลย์ (2525) การใช้น้ำมันสบู่ดำเดินเครื่องยนต์ดีเซล. ใน: ผลการวิจัยค้นคว้าการใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นพลังงานทดแทนในเครื่องยนต์ดีเซล. กองเกษตรเคมีและกองเกษตรวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ, น 11–42.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร วิภา หงษ์ตระกูล นิตย์ศรี แสงเดือน สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล แอนนา สายมณีรัตน์ ประภา ศรีพิจิตต์ วิเชียร กีรตินิจกาล เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ (2550) การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสบู่ดำโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี, การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติครั้งที่ 1, 29–30 พฤษภาคม 2550. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ น. 141–148.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร ประภา ศรีพิจิตต์ วิภา หงษ์ตระกูล รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ (2555) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตร. ว วิทย กษ 43: 267–278.

Acquaah G (2007) Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell Publishing, Malden.

Basha SD, Sujatha M (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.

Caldwell J, Teagarden K (2010) What caused the ghostly leaves? inquiry-based investigation of the genetics and molecular biology of corn albinism. In: Tested Studies for Laboratory Teaching, Proceedings of The 31st Workshop/Conference of The Association for Biology Laboratory Education (ABLE), Oklahoma, pp 50–65.

Doyle JJ, Doyle J (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13–15.

Pamidiamarri DVNS, Pandya N, Reddy MP, Radhakrishnan T (2010) Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. Mol Biol Rep 36: 901–907.

Prakash AR, Patolia JS, Chikara J, Boricha GN (2007) Flower biology and flowering behavior of *Jatropha curcas*. In: Exert seminar on *Jatropha curcas* L. fact foundation, Wageningen, pp 26–28.

Rohlf FJ (2005) NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.2 Exeter Publications, New York.

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

Sokal RR, Sneath PH (1963) Principles of numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.

Subramanian KA, Singal SK, Sexena M, Singhal S (2005) Utilization of liquid biofuels in automotive diesel engines: an Indian perspective. Biomass Bioener 29: 65–72.

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

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