



การจำแนกสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษในระดับโมเลกุล
โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และสการ์
Molecular Identification for Toxic and Non-toxic *Jatropha* Varieties
(*Jatropha curcas* L.) using Microsatellite and SCAR markers

พัชรี ลาโคตร ฉันทมาศ เชื้อแก้ว และ สุรพร เกตุงาม*

Patcharee Lakote, Chantamart Chueakaew and Sureeporn Kate-ngam*

ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University

*E-mail : sureeporn.k@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

สาร Phorbol esters (PEs) เป็นสารพิษที่พบในเมล็ดสับุดำ (*Jatropha curcas* L.) ส่งผลให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอาหารมนุษย์และสัตว์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และเครื่องหมายสการ์ จากการตรวจสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 เครื่องหมาย (ประกอบด้วย EST-microsatellite จำนวน 7 เครื่องหมาย และ G-microsatellite จำนวน 13 เครื่องหมาย) และเครื่องหมายสการ์ จำนวน 3 เครื่องหมาย ในสับุดำพันธุ์ตรวจสอบ จำนวน 6 พันธุ์ ประกอบด้วย สับุดำพันธุ์มีพิษ 3 พันธุ์ [D1 (อินเดีย), พันธุ์เมืองขอนแก่น และ พันธุ์เมืองอุบลราชธานี] และสับุดำพันธุ์ไม่มีพิษ 3 พันธุ์ (No.1, No.2 และ Mexico) พบว่า มีเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 8 เครื่องหมาย ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและแยกความแตกต่างระหว่างสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษได้อย่างชัดเจน ประกอบด้วย เครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 4 เครื่องหมาย (JESc278, MPN006, MPN008 และ MPN016) เครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 3 เครื่องหมาย (JCT16, JCT195 และ mJCENA41) และเครื่องหมายสการ์ จำนวน 1 เครื่องหมาย (ISPJ1) จากนั้นนำเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวไปตรวจสอบพันธุ์สับุดำที่รวบรวมได้ จำนวน 17 พันธุ์ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 8 เครื่องหมาย สามารถบ่งชี้สับุดำพันธุ์มีพิษ จำนวน 9 พันธุ์ จากสับุดำพันธุ์ไม่มีพิษ จำนวน 8 พันธุ์ ได้อย่างชัดเจน เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และเครื่องหมายสการ์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบและจำแนกสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์สับุดำไม่มีพิษได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ต่อไป

คำสำคัญ : สับุดำ พอร์บอลเอสเทอร์ ไมโครแซทเทลไลท์ เครื่องหมายสการ์

Abstract

Phorbol ester (PE) is a toxic compound found in *Jatropha* (*Jatropha carcus* L.) seeds, which limited their utilization for food and feed. The aim of this research was to classify toxic and non-toxic *Jatropha* varieties using microsatellite and SCAR markers. Twenty microsatellite markers, comprising 13 G-microsatellite and seven EST-microsatellite, and three SCAR markers were tested with six *Jatropha* check varieties including three toxic varieties [D1 (India), Khon Kaen local variety and Ubon Ratchathani local variety] and three non-toxic *Jatropha* varieties (No. 1, No. 2 and Mexico). Out of 23 markers tested, eight



markers including four EST-microsatellite (JESc278, MPN006, MPN008 and MPN016), three G-microsatellite (JCT16, JCT195 and mJCENA41) and one SCAR marker, ISPJ1, were able to identify toxic and non-toxic *Jatropha* check varieties. Therefore, these eight selected markers were employed to investigate 17 collected *Jatropha* varieties and the results demonstrated that they clearly distinguished eight non-toxic from nine toxic *Jatropha* varieties. The identify microsatellite and SCAR markers from this present study will be efficiently employ to identify non-toxic from toxic *Jatropha* varieties. Moreover, they will be useful for marker-assisted selection to develop non-toxic *Jatropha* varieties which will be beneficial for food and feed utilization.

Keywords : *Jatropha curcas*, Phorbol Esters, Microsatellite, SCAR Markers

บทนำ

สบู่ดำ (Physic nut) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Jatropha curcas* L. เป็นพืชในวงศ์ยาง Euphorbiaceae เช่นเดียวกับ มันสำปะหลัง ละหุ่ง และยางพารา สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ และแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในอเมริกาใต้ อเมริกากลาง แอฟริกา และเอเชีย โดยเมล็ดสบู่ดำมีน้ำมันประมาณ 40-45% ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยมี monounsaturated oleic acid และ polyunsaturated linoleic acid ในปริมาณสูง สามารถนำไปผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล เพื่อทดแทนน้ำมันดีเซลที่ใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยไม่ต้องผสมกับน้ำมันชนิดอื่น (Divakara et al., 2010; Liu et al., 2011) โดยไม่ส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางด้านอาหาร (สุภาและคณะ, 2556) ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้มีการปลูกสบู่ดำในหลายพื้นที่เพื่อใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล นอกจากนี้กากของเมล็ด (seed cake) ที่เหลือจากการสกัดน้ำมันยังมีโปรตีนที่สูงกว่ากากถั่วเหลืองเหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่เนื่องจากเมล็ดสบู่ดำมีสารที่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์หลายชนิด เช่น curcun, trypsin inhibitors และ phorbol esters (PEs) โดยเฉพาะ phorbol esters จัดเป็นสารพิษหลักพบมากที่สุดในเมล็ดสบู่ดำ สบู่ดำที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกใน แอฟริกา ตะวันตกและตะวันออก อเมริกาเหนือและอเมริกากลาง และเอเชีย มีปริมาณสาร phorbol esters ในช่วง 0.87-3.32 มิลลิกรัมต่อกรัม (Makkar et al., 1997) Makkar et al., (1998) ได้ทำการศึกษาในสบู่ดำพันธุ์มีพิษจากประเทศนิการากัว และไนจีเรีย พบว่า มีปริมาณสาร phorbol esters อยู่ในช่วง 2.17-2.30 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนสบู่ดำพันธุ์ไม่มีพิษจากประเทศเม็กซิโก พบว่ามีปริมาณสาร phorbol esters ในปริมาณต่ำ (0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม) จากรายงานการศึกษาผลทางชีวภาพของสาร phorbol esters พบว่า สามารถส่งเสริมการเกิดเนื้องอก (tumor promoting activity) โดยจะไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีน kinase C มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ การสังเคราะห์โปรตีน รวมถึงดีเอ็นเอเกิดความผิดปกติ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว lymphocyte และชักนำให้เกิดลิ้มเลือดได้ และก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังหากเกิดการสัมผัสกับร่างกาย (Ahmed and Salimon, 2009; สุภาและคณะ, 2556)

การคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์สบู่ดำให้ไม่มีพิษ (non-toxic *Jatropha*) จึงเป็นเป้าหมายของการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำเพื่อใช้ประโยชน์ในพลังงาน (ไบโอดีเซล) และกากที่เหลือจากการบีบน้ำมันออกแล้วสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนของอาหารสัตว์ได้ (Makkar et al., 2011) สบู่ดำที่พบส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณสาร phorbol esters ในเมล็ดสูง ยกเว้นสายพันธุ์สบู่ดำจากเม็กซิโกที่มีปริมาณสาร phorbol ester ในเมล็ดต่ำ สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเพิ่มคุณค่าโดยใช้ประโยชน์จากกากเมล็ดที่บีบน้ำมันแล้วไปเป็นอาหารสัตว์ได้อย่างปลอดภัย อย่างไรก็ตาม สบู่ดำพันธุ์มีพิษ และพันธุ์ไม่มีพิษมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างกัน แต่สบู่ดำพันธุ์มีพิษจะมีปริมาณของสาร phorbol ester ในเมล็ดสูง ปัจจุบันมีการรายงานการแยกความแตกต่างระหว่างสบู่ดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษโดยใช้เครื่องหมาย Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Inter simple sequence repeat (ISSR), Amplified fragment length polymorphism



(AFLP) และพัฒนาไปเป็นเครื่องหมาย Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) และ Simple sequence repeats (SSR) ซึ่งมีความจำเพาะมากขึ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์สับดูดำได้ (Basha et al., 2009; Shah et al., 2010; Na-ek et al., 2011) จากการศึกษาของ Popluechai et al. (2009) แสดงให้เห็นว่าสับดูดำพันธุ์ไม่มีพิษจากเม็กซิโก (non toxic Mexican accession: NTMA) แยกกลุ่มออกมาจากสับดูดำพันธุ์อื่นๆ และ พบว่าสับดูดำพันธุ์ไม่มีพิษจากเม็กซิโกและสับดูดำพันธุ์เมืองไทยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง (0.76) [Basha and Sujatha, 2007] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งชี้สับดูดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้สับดูดำพันธุ์ไม่มีพิษจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์สับดูดำเพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีการวิจัย

1. การรวบรวมเชื้อพันธุกรรมสับดูดำ

เก็บรวบรวมพันธุ์สับดูดำพันธุ์เมืองและพันธุ์ปรับปรุง จำนวน 17 พันธุ์ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี จำนวน 8 พันธุ์ (J12, J13, J14, J18, K4, H46, W5 และ W6) ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครราชสีมา จำนวน 6 พันธุ์ (จอมทอง, ตากฟ้า, ห้อยย่องไคร้ 1, เลย, มุกดาหาร และ ท่าพระ) ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุพรรณ) จำนวน 2 พันธุ์ (KUBP77 และ KUBP229) และพันธุ์พื้นเมืองมหาสารคาม จากเกษตรกร จ. มหาสารคาม และได้รับความอนุเคราะห์สับดูดำพันธุ์ตรวจสอบมีพิษ 3 พันธุ์ [D1 (อินเดีย), พื้นเมืองขอนแก่น, พื้นเมืองอุบลราชธานี] และสับดูดำพันธุ์ตรวจสอบไม่มีพิษ 3 พันธุ์ [No.1, No.2 และ Mexico] จากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

นำท่อนพันธุ์สับดูดำมาปลูกขยายพันธุ์ในโรงเรือนเพาะชำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอในการแยกความแตกต่างระหว่างสับดูดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษ

2. การสกัดดีเอ็นเอของสับดูดำ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของสับดูดำ โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสใน (agarose gel electrophoresis) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA) ความเข้มข้น 50 และ 100 นาโนกรัม

3. การรวบรวมและสืบค้นไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกสับดูดำพันธุ์มีพิษ และพันธุ์ไม่มีพิษ

สืบค้นไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จากฐานข้อมูลสาธารณะและบทความวิจัยที่มีการเผยแพร่ ได้แก่ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 เครื่องหมาย (ตารางที่ 1) และเครื่องหมายสการ์ จำนวน 3 เครื่องหมาย (ตารางที่ 2) มาใช้แยกความแตกต่างระหว่างสับดูดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษ

ตารางที่ 1 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของสับดูดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษ

Markers	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Repeat motif	Expected allele size (bp)		Type of markers	References
				Toxic	Non-toxic		
1. JESc278	F: ATTAGACCTCTCCCTTTTGG R: ATGCTGCTTTGTATGTGTGA	55	(AT) ₇	146, 150	150, 154	EST-SSR	สุธีพรและ ชัชวาล (2556)
2. MPN005	F: TTCTCTATTGACGGACCCAAAT R: AAGCAGAAATTAGACCTCTCC	55	(AT) ₆	-	247, 251	EST-SSR	
3. MPN006	F: CTTCTTTCCCTGTGGCTTTG R: ACCTCTCCCTTTTGGTCTGC	57	(AT) ₇	109	111	EST-SSR	
4. MPN008	F: CCCTGTGGCTTTGGTCTTTA R: ACCTCTCCCTTTTGGTCTGC	57	(AT) ₇	100	102	EST-SSR	Tanya et al. (2011)
5. MPN010	F: TGAAAGCAAACGCAGAGAAA R: GGTGCCTCCTGCATAAACA	53	(GA) ₅	-	198, 230	EST-SSR	
6. MPN016	F: TGGGATGTTGGGTGTTATGT	55	(GT) ₅	300	330	EST-SSR	



Markers	Primer sequence (5'-3')	T _m (°C)	Repeat motif	Expected allele size (bp)		Type of markers	References
				Toxic	Non-toxic		
	R: TGCACTGGAAGACTGATTTATT						
7. MPN020	F: GGCCAAGAAAGAATTGTTCG R: TCTCCATGGCTATAAAAAGCA	54	(AATT) ₃	-	139, 143	EST-SSR	
8. jcds24	F: GGATATGAAGTTTCATGGGACAAG R: TTCATTGAATGGATGGTTGTAAGG	51	(CA) ₅ (TA) ₈ (CA) ₄ ... (TA) ₅ GA(TA) ₄	204, 210	204, 216	G-SSR	
9. jcps6	F: CCAGAAGTAGAATTATAAAATTTAA R: AGCGGCTCTGACATTATGTAC	44	(AT) ₅ G(TA) ₃ ...(CT) ₃ ...(GT) ₅ CT(GT) ₃	288, 380	288, 305	G-SSR	Pamidimarri et al. (2009)
10. jcps21	F: CCTGCTGACAGGCCATGATT R: TTTCACTGCAGAGGTAGCTTGATA	54.8	(CA) ₂ ...(CA) ₄	189, 208	189, 200	G-SSR	
11. jcms30	F: GGGAAAGAGGCTCTTTGC R: ATGAGTTCACATAAAATCATGCA	48.5	(GT) ₅ T(TG) ₂	135, 144	144, 148	G-SSR	
12. JCT16	F: GCCTCCAGCATCTTTCAATC R: AACAAATCCCCATTCTCCTC	60	(GT) ₁₁	166, 170	170, 174	G-SSR	Phumichai et al. (2011)
13. JCT27	F: GCCATTAGAATGGACGGCTA R: TGCCTGAAGCTTTGATTTGA	60	(CT) ₁₇	-	235	G-SSR	
14. JCT195	F: TCAATCGTGTGGTCTAAGTTCC R: CTGCCATTGCTATCCAGGTC	58	(GA) ₂₅	250	220	G-SSR	Na-ek et al. (2011)
15. mJCENA27	F: CATTTTTCATCAAGGCCTAC R: GTATTTCTCCACACGCAACT	54 55	(GA) ₁₂	-	157	G-SSR	
16. mJCENA41	F: CTTTCTTACCCCTCATCCTT R: AAAGCCAGGACATACTTGAA	55	(AC) ₁₈	185	170	G-SSR	
17. mJCENA63	F: GCGTGGACTATCTCAACTTC R: CTGATTACGCAATGGAACATA	55 54	(GA) ₁₇	-	230	G-SSR	Bressan et al. (2012)
18. mJCENA106	F: AAGGACGAGAAAGAGAAGTTG R: TTTCGGAGGAGATGAAGAAGAC	60 59	(AGA) ₈	-	251	G-SSR	
19. mJCENA108	F: GTGTGGTGCTTACCCCTATTTT R: GCCTCCTTTCTTTCTGTTT	59 60	(GAA) ₁₀	-	270	G-SSR	
20. mJCENA110	F: GCGTAGAAACACAGGAACATCA R: ACTCTCAATGGTTGTATGGGC	60	(GT) ₁₄	-	353	G-SSR	

** T_m = Melting Temperature

ตารางที่ 2 เครื่องหมายสสารที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของสบูดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษ

Markers	Primer sequence (5'-3')	T _m (°C)	Expected allele size (bp)		References
			Toxic	Non-toxic	
1. ISPJ1	F: GAGAGAGAGAGAGGGTG R: GAGAGAGAGAGAGAAACAAT	56	543	553	Basha and Sujatha (2007)
2. ISPJ2	F: GAGAGAGAGAGTTGGGTG R: AGAGAGAGAGAGCTAGAGAG	54	absence	1,096	
3. Multiplex PCR (NT-JC/SCAR/OPQ15, JCITS-1 and JCITS2)	NT-JC/SCAR I/OPQ15-F: GGGTAACGTGGTGGGGA NT-JC/SCAR I/OPQ15-R: GGGTAACGTGTAAGTATT JCITS-1-F: ACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAA JCITS-2-R: CCTGGGGTCGCGATGTGAGCGT	55	650	650, 430	Mastan et al. (2012)

** T_m = Melting Temperature, absence = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

4. การคัดกรองและตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวเองในหลอดทดลอง (PCR amplification) ของสับุดำโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีรายงานว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษเบื้องต้นได้ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 เครื่องหมาย ประกอบด้วย EST-microsatellit จำนวน 6 เครื่องหมาย และ G-microsatellite จำนวน 14 เครื่องหมาย (ตารางที่ 1) และเครื่องหมายสการ์ จำนวน 3 เครื่องหมาย (ตารางที่ 2) มาทดสอบกับสับุดำพันธุ์ตรวจสอบ จำนวน 6 พันธุ์ ประกอบด้วย สับุดำพันธุ์มีพิษ 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นเมืองขอนแก่น, พื้นเมืองอุบลราชธานี และ D1 (อินเดีย) และสับุดำพันธุ์ไม่มีพิษ 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ No.1, No.2 และ Mexico เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 นาโนกรัม, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTPs, 0.2 μM Forward prim, 0.2 μM Reverse primer, 1xPCR buffer, 1 units *Tag* polymerase ปรับปริมาตรด้วย sterilized distilled water จนได้ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR profile) มีรายละเอียดดังนี้ รอบแรก denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วยจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที specific annealing นาน 30 วินาที (อุณหภูมิของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 1 และ 2) และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ long extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นนำ PCR product ของเครื่องหมาย EST/G-microsatellite มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) ความเข้มข้น 6% และ PCR product ของเครื่องหมายสการ์ มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสความเข้มข้น 1%

5. การยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และสการ์ในการจำแนกสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษ

นำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และสการ์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและแยกความแตกต่างระหว่างสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษได้ มาทำการตรวจสอบเพื่อบ่งชี้สับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษที่เก็บรวบรวมได้ จำนวน 18 พันธุ์ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) จากนั้นนำ PCR product ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 6% และนำ PCR product ของเครื่องหมายสการ์มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสความเข้มข้น 1%

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษ

1.1 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

จากการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 เครื่องหมาย ประกอบด้วย EST-microsatellit จำนวน 6 เครื่องหมาย และ G-microsatellite จำนวน 14 เครื่องหมาย (ตารางที่ 1) เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษโดยใช้สับุดำ จำนวน 6 พันธุ์ ประกอบด้วย สับุดำพันธุ์ตรวจสอบมีพิษ 3 พันธุ์ [D1 (อินเดีย), พื้นเมืองขอนแก่น, พื้นเมืองอุบลราชธานี] และสับุดำพันธุ์ตรวจสอบไม่มีพิษ 3 พันธุ์ [No.1, No.2 และ Mexico] จากผลการตรวจสอบ พบว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 7 เครื่องหมาย สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษได้ ประกอบด้วย เครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 4 เครื่องหมาย คือ JESc278, MPN006, MPN008 และ MPN016 และเครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ JCT16, JCT195 และ mJCENA41 โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดังกล่าว สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษทั้ง 6 พันธุ์ได้อย่างชัดเจน ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละเครื่องหมาย มีดังนี้ เครื่องหมาย JESc278 แสดงอัลลีลขนาด



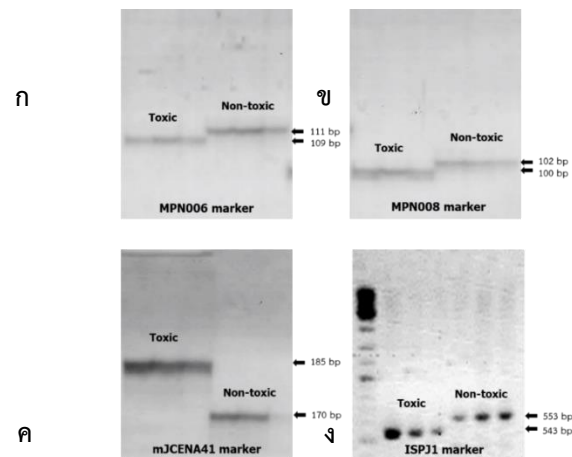
146 กับ 150 bp (สบูดำพันธุ์มีพิษ) และอัลลีลขนาด 150 กับ 154 (สบูดำพันธุ์ไม่มีพิษ), เครื่องหมาย MPN006 แสดงอัลลีลขนาด 109 bp (สบูดำพันธุ์มีพิษ) และอัลลีลขนาด 111 bp (สบูดำพันธุ์ไม่มีพิษ), เครื่องหมาย MPN008 แสดงอัลลีลขนาด 100 bp (สบูดำพันธุ์มีพิษ) และอัลลีลขนาด 102 bp (สบูดำพันธุ์ไม่มีพิษ), เครื่องหมาย MPN016 ขนาดอัลลีลที่ได้ 300 bp (สบูดำพันธุ์มีพิษ) และ 330 bp (สบูดำพันธุ์ไม่มีพิษ), เครื่องหมาย JCT16 แสดงอัลลีลขนาด 166, 170 bp (สบูดำพันธุ์มีพิษ) และอัลลีลขนาด 170, 174 bp (สบูดำพันธุ์มีพิษ), เครื่องหมาย JCT195 ขนาดอัลลีลที่ได้ 250 bp (สบูดำพันธุ์มีพิษ) และ 220 bp (สบูดำพันธุ์ไม่มีพิษ) และเครื่องหมาย mJCENA41 แสดงอัลลีลขนาด 185 bp (สบูดำพันธุ์มีพิษ) และอัลลีลขนาด 170 bp (สบูดำพันธุ์ไม่มีพิษ) ตามลำดับ (ภาพที่ 1 ก, ข และ ค)

1.2 การตรวจสอบเครื่องหมายสสาร

ตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายสสาร จำนวน 3 เครื่องหมาย (ตารางที่ 3) ในสบูดำพันธุ์ตรวจสอบจำนวน 6 พันธุ์ ประกอบด้วย สบูดำพันธุ์ตรวจสอบมีพิษ ได้แก่ D1 (อินเดีย), พื้นเมืองขอนแก่น, พื้นเมืองอุบลราชธานี และสบูดำพันธุ์ตรวจสอบไม่มีพิษ ได้แก่ No.1, No.2 และ Mexico ผลการตรวจสอบพบว่า เครื่องหมาย ISPJ1 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสบูดำพันธุ์ตรวจสอบมีพิษและพันธุ์ตรวจสอบไม่มีพิษได้อย่างชัดเจน โดยเครื่องหมาย ISPJ1 เป็นเครื่องหมายสสารที่มีลักษณะของเครื่องหมายเป็นแบบข่มร่วม (Co-dominance marker) โดยแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 543 bp บ่งชี้ว่าเป็นสบูดำพันธุ์มีพิษ และแสดงอัลลีลขนาด 553 bp บ่งชี้ว่าเป็นสบูดำพันธุ์ไม่มีพิษ (ภาพที่ 1)

เครื่องหมาย ISPJ2 พบว่า ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสบูดำพันธุ์ตรวจสอบทั้ง 6 พันธุ์ได้ชัดเจน โดยเครื่องหมาย ISPJ2 ซึ่งเป็นเครื่องหมายสสารนี้มีลักษณะของเครื่องหมายเป็นแบบข่มสมบูรณ์ (Dominance marker) โดยสบูดำที่ไม่มีพิษจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1096 bp ขณะที่สบูดำพันธุ์มีพิษจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (absence) จากการศึกษาค้นคว้าสามารถบ่งชี้พันธุ์ No.1 ซึ่งเป็นตรวจสอบสบูดำไม่มีพิษได้เพียงพันธุ์เดียว ส่วนพันธุ์อื่นไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เครื่องหมายสสารของสบูดำที่พัฒนาโดย Basha and Sujatha (2007) สามารถเป็นได้ทั้งเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบข่มร่วม (ISPJ1 marker) และแบบข่มสมบูรณ์ (ISPJ2 marker) สอดคล้องกับ Fogher et al., (2010) ที่รายงานในการศึกษาจีโนมของมะกอก (Olive genomic) ว่าเครื่องหมายสสารสามารถเป็นได้ทั้งเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบข่มร่วมและข่มสมบูรณ์

ส่วน multiplex PCR (NT-JC/SCARI/OPQ15 and JCITS-1/JCITS2) ซึ่งพัฒนาโดย Mastan et al., (2012) จะใช้ไพรเมอร์สองชุด ประกอบด้วย NT-JC/SCARI/OPQ15-F/ NT-JC/SCARI/OPQ15-R และ JCITS-1-F/JCITS2-R โดยรายงานไว้ว่า สบูดำพันธุ์ไม่มีพิษจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 650 และ 430 bp ส่วนสบูดำพันธุ์มีพิษจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 650 bp แต่จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวไม่สามารถแยกความแตกต่างของสบูดำพันธุ์ตรวจสอบทั้ง 6 พันธุ์ได้อย่างชัดเจน

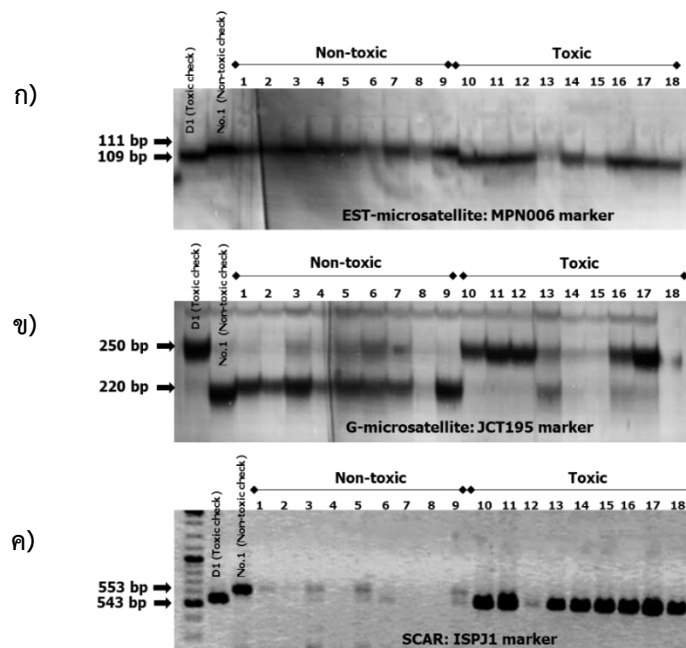


ภาพที่ 1 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (ก) MPN006 (ข) MPN008 และ (ค) mJCEN41 และ (ง) อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของเครื่องหมายสการ์ ISPJ1 แสดงความแตกต่างของสับุดำพันธุ์มีพิษ [1=D1 (อินเดีย), 2=พื้นเมืองขอนแก่น และ 3=พื้นเมืองอุบลราชธานี] และพันธุ์ไม่มีพิษ [4=No.1, 5=No.2 และ 6=Mexico]

1.3 การยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์และสการ์ในการจำแนกสับุดำมีพิษและไม่มีพิษ

นำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์และสการ์ ที่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษได้ จำนวน 8 เครื่องหมาย มาตรวจสอบสับุดำที่รวบรวมได้ จำนวน 17 พันธุ์ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3) พบว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 7 เครื่องหมาย ประกอบด้วย เครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 4 เครื่องหมาย [JESc278, MPN016, MPN006 (ภาพที่ 2 ก) และ MPN008] เครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 3 เครื่องหมาย [JCT16, JCT195 (ภาพที่ 2 ข) และ mJCEN41] สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลสับุดำทั้ง 17 พันธุ์ได้อย่างชัดเจน โดยเป็นสับุดำพันธุ์มีพิษ จำนวน 9 พันธุ์ ได้แก่ พื้นเมืองมหาสารคาม, จอมทอง, ตากฟ้า, ห้อยฮ่องไคร้ 1, เลย, มุกดาหาร, ท่าพระ, KUBP77 และ KUBP229 และสับุดำพันธุ์ไม่มีพิษ จำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ J12, J13, J14, J18, K4, H46, W5 และ W6 (ตารางที่ 3) ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับปริมาณสาร phorbol esters ในสับุดำพันธุ์ไม่มีพิษ จำนวน 6 พันธุ์ (J12, J13, J14, L18, K4 และ W5) ที่วิเคราะห์โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [ข้อมูลจากศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี กรมวิชาการเกษตร] (ตารางที่ 3)

ส่วนการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมาย ISPJ1 (SCAR marker) พบว่า สามารถบ่งชี้สับุดำพันธุ์มีพิษได้ 9 พันธุ์ เช่นเดียวกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 543 bp (ภาพที่ 2 ค) และสามารถบ่งชี้สับุดำพันธุ์ไม่มีพิษซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 553 bp ได้ 3 พันธุ์ ได้แก่ J14, J18 และ W6 และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในสับุดำพันธุ์ J12, J13, K4, H46 และ W5



ภาพที่ 2 ก) โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของเครื่องหมาย JCT195 (G-microsatellite) ข) เครื่องหมาย MPN006 (EST-microsatellite) และ ค) อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของเครื่องหมาย ISPJ1 (SCAR marker) ของสับดูจำนวน 17 พันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ตรวจสอบมีพิษ [พันธุ์ D1 (อินเดีย)] และพันธุ์ตรวจสอบไม่มีพิษ (พันธุ์ No. 1)

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง (locus specific markers) แสดงความแตกต่างในระดับอัลลีล (สุริพร, 2546) มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างระหว่างสับดูพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะเครื่องหมาย EST-microsatellite ที่พัฒนามาจากยีนที่มีการแสดงออก (Expressed Sequence Tag) ส่วนเครื่องหมายสการ์เป็นเครื่องหมายที่พัฒนามาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม ได้แก่ RAPD, AFLP, ISSR โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความแม่นยำ เฉพาะเจาะจง (locus specific) มากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีลักษณะสุ่มสมบูรณ์ และสามารถทำซ้ำแล้วได้ผลเหมือนเดิม (reproducible amplification) การแยกความแตกต่างระหว่างสับดูพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ยาก เนื่องจากสับดูทั้งสองสายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามสับดูพันธุ์มีพิษจะมีสาร phorbol ester ในเมล็ดสูง จะต้องตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ HPLC มีค่าใช้จ่ายสูง ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งนำมาใช้ตรวจสอบและบ่งชี้สับดูพันธุ์ไม่มีพิษ (Pamidimarri et al., 2009; Trebbi et al., 2019) ดังนั้นจึงได้มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยในการตรวจสอบและค้นหาพันธุ์สับดูที่ไม่มีพิษได้ Pamidimarri et al., (2008) รายงานการใช้เครื่องหมาย RAPD และ AFLP ในการแยกความแตกต่างของสับดูพันธุ์มีพิษออกจากพันธุ์ไม่มีพิษได้ และพัฒนาเครื่องหมาย RAPD ดังกล่าวเป็นเครื่องหมายสการ์ที่มีความเฉพาะเจาะจง เพิ่มความแม่นยำในการตรวจสอบมากยิ่งขึ้น สับดูที่พบโดยทั่วไปในแถบทวีปแอฟริกาและเอเชีย รวมทั้งในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นสับดูพันธุ์มีพิษ ซึ่งมีปริมาณของสาร phorbol esters สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสับดูพันธุ์ที่มีสารพิษต่ำ (นุจรินและคณะ, 2552; Makkar et al., 2011) ส่วนสับดูพันธุ์ไม่มีพิษส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดในประเทศเม็กซิโก ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีปริมาณของสาร phorbol esters ต่ำ และเมล็ดสามารถนำไปบริโภคเป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ได้ (Basha et al., 2009; Popluechai et al., 2009)



ตารางที่ 3 อัลลีลที่แสดงความแตกต่างในสับุดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์และสการ์

Lines/Varieties	Type of markers								Phorbol esters (mg/g)	Specific characters
	Microsatellite							SCAR		
	JESc278	MPN006	MPN008	MPN016	UCT195	UCT16	mJCENA41			
								ISPJ11/		
1. พันเมืองมหาสารคาม	146, 150	109	100	300	250	166, 170	185	543	na	Toxic
2. จอมทอง	146, 150	109	-	300	-	166, 170	185	543	na	Toxic
3. ตากฟ้า	146, 150	109	100	300	-	166, 170	185	543	na	Toxic
4. ห้อยช่อไคร้ 1	146, 150	109	-	300	-	166, 170	185	543	na	Toxic
5. เลย	146, 150	109	100	300	-	166, 170	185	543	na	Toxic
6. มุกดาหาร	146, 150	109	100	300	250	166, 170	185	543	na	Toxic
7. ท่าพระ	146, 150	109	100	300	250	166, 170	185	543	na	Toxic
8. KUBP77	146, 150	109	100	300	-	166, 170	185	543	na	Toxic
9. KUBP229	146, 150	109	100	300	250	166, 170	185	543	na	Toxic
10. J12	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	-	0.312	Non-toxic
11. J13	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	-	1.152	Non-toxic
12. J14	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	553	1.153	Non-toxic
13. J18	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	553	1.975	Non-toxic
14. K4	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	-	1.309	Non-toxic
15. H46	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	-	na	Non-toxic
16. W5	150, 154	111	102	330	-	170, 174	170	-	0.488	Non-toxic
17. W6	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	553	na	Non-toxic
18. D1-อินเดีย	146, 150	109	100	300	250	166, 170	185	543	na	Toxic check
19. พันเมืองขอนแก่น	146, 150	109	100	300	250	166, 170	185	543	na	Toxic check
20. พันเมืองอุบลราชธานี	146, 150	109	100	300	250	166, 170	185	543	na	Toxic check
21. Mexico	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	553	na	Non-toxic check
22. No. 1	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	553	na	Non-toxic check
23. No. 2	150, 154	111	102	330	220	170, 174	170	553	na	Non-toxic check

หมายเหตุ: - = ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสับุดำที่นำมาศึกษาได้, na = non-analysis of phorbol esters

การปรับปรุงพันธุ์สับุดำให้มีปริมาณของสาร phorbol esters ต่ำหรือมีความเป็นพิษน้อยเป็นที่สนใจของนักปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากปัจจุบันหลายประเทศเริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับพลังงานทดแทน ซึ่งสับุดำเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำไปผลิตน้ำมันไบโอดีเซลเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลจากธรรมชาติ ซึ่งปัจจุบันมีปริมาณลดลง นอกจากนี้กากของเมล็ดที่เหลือจากการผลิตไบโอดีเซลมีโปรตีนสูงถึง 19-27% (Basha et al., 2009; Popluechai et al., 2009) สามารถนำไปเป็นแหล่งโปรตีนของอาหารสัตว์ได้ จากรายงานของ นุจรและคณะ (2552) ได้ศึกษาปริมาณสาร phorbol esters ในส่วนต่างๆ ของสับุดำพันธุ์มีพิษน้อยจากประเทศเม็กซิโก ประกอบด้วย ส่วนของใบ เนื้อผล และเมล็ด พบว่าในสับุดำมีปริมาณสาร phorbol esters มากที่สุด รองลงมาคือส่วนเปลือกผลและเนื้อในเมล็ด และพบสาร phorbol esters ที่เปลือกหุ้มเมล็ดน้อยที่สุด

การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้สับุดำพันธุ์ไม่มีพิษได้มาช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection) ในการปรับปรุงพันธุ์สับุดำให้มีพิษน้อยนั้นจะช่วยเพิ่มความแม่นยำและมีความรวดเร็วมากกว่าการปรับปรุงพันธุ์สับุดำแบบมาตรฐาน (conventional breeding) จากการศึกษาพบว่า มีเครื่องหมาย EST/G-microsatellite จำนวน 7 เครื่องหมาย และเครื่องหมายสการ์ (ISPJ1 marker) สามารถนำมาใช้บ่งชี้สายพันธุ์สับุดำไม่มีพิษได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และเครื่องหมายสการ์ดังกล่าว เป็นเครื่องหมายแบบซ่มร่วม (co-dominant markers) สามารถบ่งชี้ต้นที่เป็นสายพันธุ์แท้ (homozygous alleles) ออกจากสายพันธุ์ทาง (heterozygous alleles)



ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สุริพร, 2546; Poncet et al., 2006) สบู่ดำพันธุ์ไม่มีพิษที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นพลังงานทดแทน (ไบโอดีเซล) เพื่อใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลจากธรรมชาติ และกากของเมล็ดสบู่ดำที่ไม่มีพิษหลังจากการบีบน้ำมันแล้วสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้อย่างปลอดภัย ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์ ช่วยลดภาวะโรคระบาด และเป็นการอนุรักษ์พลังงานอย่างยั่งยืน

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เครื่องหมาย EST-microsatellite (JESc278 MPN006, MPN008 และ MPN016), G-microsatellite (JCT16, JCT195 และ mJCENA41) และเครื่องหมายสการ์ (ISPJ1 marker) สามารถจำแนกสบู่ดำพันธุ์มีพิษและพันธุ์ไม่มีพิษได้อย่างชัดเจน เครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบค้นหาสบู่ดำพันธุ์ที่มีพิษน้อยหรือไม่มีพิษได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีพิษน้อยหรือไม่มีพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครราชสีมา และศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุวรรณ) ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์สบู่ดำที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- นุจรี จันทรแย้ม, วิฑูรย์ ใจผ่อง และพรศิริ หลีวนิช. (2552). การศึกษาปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในใบ เนื้อผล และเมล็ด
สบู่ดำพันธุ์มีพิษน้อย จากประเทศเม็กซิโก. *เกษตรศาสตร์ก้าวไกล อาหารปลอดภัย สู้ภัยเศรษฐกิจ. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 6* (น. 93-100.)
- สุภา แก้วสุริวงษ์, จันทรสม โคมเวียน, สิทธิรักษ์ รอยตระกูล และวรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล. (2556). เทคนิคโปรตีโอมิกสำหรับการวิเคราะห์วิถีชีวสังเคราะห์สารพิษในสบู่ดำ. *Thai Journal of Genetics*. 2013, 6(2), 115-127.
- สุริพร เกตุงาม. (2546). เครื่องหมายโมเลกุลในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. *วารสารวิชาการ ม.อว. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 5, 37-58.
- สุริพร เกตุงาม และชัชวาล จัทรายุธิรัตน์. (2556). *การพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR จากฐานข้อมูล Expressed sequence tags เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ* (รายงานการวิจัย). อุบลราชธานี: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- Ahmed, A. W. and Salimon, J. (2009). Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha curcas* seed oil. *European Journal of Scientific Research*, 31, 429-436.
- Basha, S. D. and 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.
- Basha, S. D., Francis, G., Makkar, H. P. S., Becker, K. and Sujatha, M. (2009). A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science*, 176, 812-823.



- Bressan, E., Scotton, D., Ferreira, R. R. and Jorge, E. C. (2012). Development of microsatellite primers for *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and transferability to congeners. *American Journal of Botany*, 99(6), 237-239. doi: 10.3732/ajb.1100532.
- Divakara, B. N., Upadhyaya, H. D., Wani, S. P. and Gowda, L. C. L. (2010). Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Applied Energy*, 87, 732-742.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Fogher, C., Busconi, M., Sebastiani, L. and Bracci, T. (2010). Olive Genomics. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 17-24. doi:10.1016/b978-0-12-374420-3.00002-4.
- Liu, P., Wang, C. M., Li, L., Sun, F. and Yue, G. H. (2011). Mapping QTLs for oil traits and eQTLs for oleosin genes in *Jatropha*. *BMC Plant Biology*, 11, 132. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-132>.
- Makkar, H. P. S., Becker, K., Sporer, F. and Wink, M. (1997). Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenance of *Jatropha curcas*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3152-3157. doi: 10.1021/jf970036j.
- Makkar, H. P. S., Aderibigbe, A. O. and Becker, K. (1998). Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chemistry*, 62(2), 207-215.
- Makkar, H. P. S., Kumar, V., Oyeleye, O. O., Akinleye, A. O., Angulo-Escalante, M. A. and Becker, K. (2011). *Jatropha platyphylla*, a new non-toxic *Jatropha* species: Physical properties and chemical constituents including toxic and antinutritional factors of seeds. *Food Chemistry*, 125, 63-71.
- Mastan, S. G., Sudheer, P. D. V. N., Rahman, H., Reddy, M. P. and Chikara, J. (2012). Development of SCAR marker specific to non-toxic *Jatropha curcas* L. and designing a novel multiplexing PCR along with nrDNA ITS primers to circumvent the false negative detection. *Molecular Biotechnology*, 50, 57-61.
- Na-ek, Y., Wongkaew, A., Phumichai, T., Kongsiri, N., Kaveeta, R., Seewongchai, T. and Phumichai, C. (2011). Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 14(2), 105-110.
- Pamidimarri, D. V. N. S., Singh, S., Mastan, S. G., Patel, J. and Reddy, M. P. (2009). Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. *Molecular Biology Reports*, 36, 1357-1364.
- Phumichai, C., Phumichai, T., Kongsiri, N., Wongkaew, A., Sripichit, P. and Kaveeta, R. (2011). Isolation of 55 microsatellite markers for physic nut (*Jatropha curcas* L.) and its closely related species. *Biologia Plantarum*, 55(2), 387-390.
- Poncet, V., Rondeau, M., Trachant, C., Cayrel, A., Hamon, S., Kochko, A. D. and Hamon, P. (2006). SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as makers for the *Coffea* genus. *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 436-449.
- Popluechai, S., Breviario, D., Mulpuri, S., Makkar, H. P. S., Raorane, M., Reddy, A. R., Palchetti, E., Gatehouse, A. M. R., Syers, J. K., O'Donnell, A. G. and Kohli, A. (2009). Narrow genetic and apparent phonetic diversity in *Jatropha curcas*: initial success with generating low phorbol ester interspecific hybrid. *Nature Preceeding*.



- Shah, I., Boora, K. S. and Dhillon, R. S. (2010). Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 9, 50-57.
- Tanya, P., Dachapak, S., Tar, M. M. and Srinives, P. (2011). New microsatellite markers classifying nontoxic and toxic *Jatropha curcas*. *Journal of Genetics*, 92, 76-78. <https://doi.org/10.1007/s12041>
- Trebbi, D., Ravi, S., Broccanello, C., Chiodi, C., Francis, G., Oliver, J., Mulpuri, S., Srinivasan, S. and Stevanato, P. (2019). Identification and validation of SNP markers linked to seed toxicity in *Jatropha curcas* L. *Scientific Reports*, 9(1), 1-7. doi: 10.1038/s41598-019-46698-4.