

การเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอและการศึกษาพันธุกรรมการผสมข้ามชนิดในสบู่ดำ

DNA methylation and genetic study of interspecific hybridization in *Jatropha curcas* L.

ศิรินันท์ สุวรรณน้อย¹, ฐิติ กาญจนเกตุ¹, ปกฉัตร กุศลกรรมบถ¹, นิตยศรี แสงเดือน¹ และ วิภา หงษ์ตระกูล^{1,2*}

Sirinan Suwannoi¹, Thiti Kanchanaketu¹, Pokchut Kusolkumbot¹, Nitsri Sangduen¹ and Vipa Hongtrakul^{1,2*}

¹ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

²ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ-มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

²Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, National Research University-Kasetsart University, Bangkok 10900

*Corresponding author: fscivph@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสบู่ดำ สบู่แดง เข็มปัตตาเวีย หนุมานนั่งแท่น ผื่นต้น และละหุ่ง โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP markers) จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 564 แถบ นำมาจัดกลุ่มความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA สามารถจำแนกละหุ่งซึ่งเป็นพืชในสกุล *Ricinus* ออกจากพืชสกุล *Jatropha* ได้ชัดเจน และสามารถจำแนกพืชในสกุล *Jatropha* ได้เป็นสองกลุ่มใหญ่คือ กลุ่มของสบู่ดำ เข็มปัตตาเวีย หนุมานนั่งแท่น และกลุ่มของ ผื่นต้น สบู่แดง การทดลองผสมข้ามระหว่างสบู่ดำกับพืชในสกุล *Jatropha* อีก 4 ชนิดพบว่าการผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย มีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม สบู่ดำกับหนุมานนั่งแท่น และ สบู่ดำกับผื่นต้น ก็สามารถผสมข้ามได้ด้วย เมื่อนับจำนวนดอกของลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย พบว่าอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้ ตั้งแต่ 1:9.1 ถึง 1:14.9 อยู่ในช่วงระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย การศึกษาเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอของลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย พบว่าลูกผสมทุกต้นมีเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอต่ำกว่าพ่อแม่ การวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี principal component analysis แสดงให้เห็นว่าลูกผสมทุกต้นมีรูปแบบของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอ คล้ายสบู่ดำมากกว่าเข็มปัตตาเวีย การศึกษาผลการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ในลูกผสม

ระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย สบู่ดำกับหนุมานนั่งแท่น และ สบู่ดำกับผื่นต้น พบว่าโดยส่วนใหญ่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสปกติ แต่ก็พบ tetrad ที่ผิดปกติบ้างในบางเซลล์ของลูกผสม

ABSTRACT

Genetic relationship among *Jatropha curcas* L., *J. gossypifolia* L., *J. integerrima* Jacq., *J. podagrica* Hook., *J. multifida* L. and *Ricinus communis* L. was studied using 10 AFLP primer pairs. A total of 564 DNA bands were generated and used for cluster analysis. Using UPGMA method, *R. communis* was clearly separated from *Jatropha* spp, as well as separated the *Jatropha* spp. into two groups. The first group comprised of *J. curcas*, *J. integerrima* and *J. podagrica*, whereas the second group consisted of *J. multifida* and *J. gossypifolia*. The interspecific hybridization was carried out between *J. curcas* and other *Jatropha* species. The results showed that cross between *J. curcas* and *J. integerrima* was the most successful. However, some hybrids were also obtained from *J. curcas* x *J. podagrica* and *J. curcas* x *J. multifida*. The observed ratio of female and male flowers of hybrids from *J. curcas* and *J. integerrima*

were 1:9.1 to 1:14.9 which fall between two parents. Percentage of methylation in all hybrid derived from *J. curcas* x *J. integrerrima* was lower than that of the parents. Principal component analysis of methylation fingerprints revealed that the pattern of DNA methylation in all hybrids from *J. curcas* x *J. integrerrima* was more similar to *J. curcas* than *J. integrerrima*. Meiotic cells of the hybrids from *J. curcas* x *J. integrerrima*, *J. curcas* x *J. podagrica* and *J. curcas* x *J. multifida* were also studied. Majority of the cells investigated were normal. However, some abnormal tetrads were observed in some cells of hybrids.

คำสำคัญ: การผสมข้ามชนิด สบู่ดำ เอเอฟแอลพี การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ

Keywords: Interspecific hybridization, *Jatropha curcas* L., AFLP, DNA methylation

บทนำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae สามารถเจริญได้ดีในสภาพพื้นที่ที่มีความชื้นต่ำ จึงทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี (Openshaw, 2000; Kaushik *et al.*, 2007) พืชในกลุ่มนี้ประกอบด้วยพืชมากกว่า 470 ชนิด ซึ่งเป็นทั้งพืชที่เป็นไม้ประดับ เช่น หนุมานนั่งแท่น หรือพืชที่ให้ผลผลิตยาง เช่น ยางพารา พืชในกลุ่มนี้ยังประกอบด้วย ป๊ายเทียน มันสำปะหลัง และมะยม เป็นต้น (พรชัย, 2549) สบู่ดำเป็นพืชที่มีประโยชน์ใช้ป้องกันไฟป่า เป็นแนวรั้วป้องกันหรือใช้เป็นแนวกันในการเลี้ยงสัตว์ ใช้ป้องกันแรงลมและการกัดเซาะของดิน เปลือกไม้ของสบู่ดำประกอบด้วยสารแทนนินมาก สามารถใช้ในการผลิตสี dark blue dye ใบของสบู่ดำสามารถใช้เลี้ยงหนอนไหม ใช้เป็นยารักษาอาการอักเสบ น้ำยางสามารถใช้เป็นยาปราบศัตรูพืช รวมถึงใช้ในการรักษาบาดแผล ดอกสบู่ดำสามารถดึงดูดแมลงพวกผึ้งได้ดี จึงนำมาใช้ในการเลี้ยงผึ้งเพื่อผลิตน้ำผึ้งได้ เมล็ดสามารถใช้ทำยาฆ่าแมลง น้ำมันจากสบู่ดำสามารถใช้ผลิตสบู่ได้ (Openshaw, 2000; Augustus *et al.*, 2002) แต่

ประโยชน์จากสบู่ดำที่ดึงดูดความสนใจจากทั่วโลกให้สนใจพืชชนิดนี้คือ ศักยภาพของสบู่ดำในการใช้เป็นพลังงานทดแทน (Sirisomboon *et al.*, 2007; Ranade *et al.*, 2008) และมีข้อได้เปรียบมากกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นในด้านระยะเวลาการให้ผลผลิต โดยสบู่ดำจะให้ผลผลิตตั้งแต่ปีแรก ขณะที่พืชน้ำมันชนิดอื่น เช่น ปาล์ม จะใช้เวลานานกว่า จึงเป็นเหตุผลให้มีการวิจัยเพื่อพัฒนาพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตมากขึ้น อย่างไรก็ตามสบู่ดำยังมีข้อด้อยที่สำคัญคือ ผลผลิตที่ได้ยังไม่สูงมากนัก เป็นผลให้การปลูกสบู่ดำในเชิงพาณิชย์อาจจะไม่คุ้มต้นทุน จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตที่สูงขึ้น แต่จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของสบู่ดำ พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ (ศิริศักดิ์ และคณะ, 2550; ญาตรี และคณะ, 2552; Kaushik *et al.*, 2007; Ram *et al.*, 2008; Ranade *et al.*, 2008) ซึ่งอาจส่งผลให้แนวทางการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ ด้วยวิธีผสมภายในชนิด อาจประสบความสำเร็จได้ยาก เนื่องจากหากพันธุกรรมของสบู่ดำมีความใกล้เคียงกันมาก โอกาสที่จะได้ลักษณะใหม่ๆ จากการผสมพันธุ์ของสบู่ดำก็จะน้อยมากตามไปด้วย จากเหตุผลดังกล่าว จึงน่าจะพิจารณาแนวทางการพัฒนาสายพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตสูง โดยการขยายฐานพันธุกรรมของสบู่ดำให้กว้างขึ้น เช่น การผสมข้ามกับพืชชนิดอื่นๆ เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ลูกผสมที่มีผลผลิตสูงขึ้น และสามารถต้านทานต่อโรคและแมลงได้ดีขึ้น พืชในสกุล *Jatropha* ในประเทศไทยมีอยู่หลายชนิดได้แก่ สบู่ดำ (*J. curcas* L.) สบู่แดง (*J. gossypifolia* L.) เข็มปัตตาเวีย (*J. integrerrima* Jacq.) ฝิ่นต้น (*J. multifida* L.) และ หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica* Hook.) โดยมีรายงานเกี่ยวกับงานทดลองผสมพันธุ์สบู่ดำโดย Sujatha and Prabakaran (2003) ซึ่งสร้างลูกผสมระหว่าง *J. curcas* และ *J. integrerrima* Jacq. ที่มีลักษณะระหว่างพ่อแม่ มีสีดอกที่แตกต่างกันเด่นชัดคือ ชมพูเข้ม ชมพูอ่อน และขาว ลูกผสมที่ได้สามารถให้ผล แต่การพัฒนาของเมล็ดไม่เป็นปกติ เมื่อนำลูกผสมที่ได้ไปผสมกลับกับสบู่ดำ พบความหลากหลายของสีดอก ตั้งแต่สีแดงเข้ม เขียว ไปถึงขาว และเพิ่มความสมบูรณ์ของเรณู เพิ่มการติดผล นอกเหนือจากการเพิ่มคุณค่าในการเป็นไม้ประดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองผสมข้ามชนิดระหว่าง
สบู่ดำกับพืชในสกุล *Jatropha* อีก 4 ชนิดได้แก่ สบู่แดง เข็ม
ปัตตาเวีย ฝิ่นต้น และหนุมานนั่งแท่น เพื่อศึกษา
ความสามารถในการผสมระหว่างแต่ละคู่ผสม และศึกษา
ลักษณะของลูกผสมที่ได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสัมพันธ์
ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ผสม การตรวจสอบ
ระดับของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอ (DNA methylation)
เปรียบเทียบระหว่างสบู่ดำและเข็มปัตตาเวีย ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อแม่
แม่กับลูกผสมรุ่น F_1 ที่ได้โดยใช้เทคนิค methylation
sensitive amplification polymorphism (MSAP) ทั้งนี้มี
รายงานการศึกษาที่บ่งชี้ว่า การเติมหมู่เมทิลมีความผันแปร
ในลูกผสมเมื่อเทียบกับพ่อแม่ และอาจมีความเกี่ยวข้องกับ
การเกิด heterosis (Zhao *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011)
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสใน
ลูกผสมของบางคู่ผสม

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP

สกัดดีเอ็นเอพืชในสกุล *Jatropha* ได้แก่ สบู่ดำ สบู่
แดง เข็มปัตตาเวีย ฝิ่นต้น หนุมานนั่งแท่น และใช้พืชต่างสกุล
คือ กระจับปี่ (*Ricinus communis* L.) เพื่อเป็น outgroup โดย
ใช้วิธีการประยุกต์จาก Doyle and Doyle (1990) ตรวจสอบ
ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ จากนั้นสร้างลาย
พิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ตามวิธีการของ Vos *et al.*
(1995) โดยตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ
EcoRI และ *MseI* แล้วเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอเข้ากับ adapter ที่
จำเพาะกับบริเวณจุดตัดของเอนไซม์ โดย adapter ที่ใช้มี
ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

EcoRI adapter 5' -CTCGTAGACTGCGTACC- 3'

3'-CATCTGACGCATGGTTAA- 5'

MseI adapter 5' -GACGATGAGTCCTGAG- 3'

3'-TACTCAGGACTCAT- 5'

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ครั้งที่ 1 (pre-
selective amplification) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ

กับ adapter ทั้งสองชนิดที่เพิ่มเบสที่ปลายด้าน 3' จำนวน 1
เบสคือ E+A และ M+C หลังจากนั้นทำ PCR ครั้งที่ 2
(selective amplification) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ
กับ adapter ทั้งสองชนิดที่เพิ่มเบสที่ปลายด้าน 3' จำนวน 3
เบส ในการศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์ในขั้นตอนของ selective
amplification จำนวน 10 คู่ ได้แก่ E+ACT/M+CAC,
E+ACT/M+CAG, E+ACT/M+CAT, E+ACC/M+CAA,
E+ACC/M+CAC, E+ACC/M+CAG, E+ACC/M+CAT,
E+ACG/M+CAA, E+ACG/M+CAC, E+ACG/M+CAG
ตรวจสอบผลผลิต PCR ใน 6 % denaturing
polyacrylamide gel และย้อมเจลดด้วยซิลเวอร์ไนเตรดตาม
วิธีการของ Caetano-Anolles (1997) วิเคราะห์ผลลายพิมพ์
ดีเอ็นเอเพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้
โปรแกรม NTSYS pc. เวอร์ชัน 2.20k (Rohiff, 2005) การ
คำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม วิเคราะห์ตามวิธีของ
Jaccard (1908) โดยสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี
UPGMA จัดกลุ่มโดยการคำนวณ cophenetic value โดย
วิเคราะห์ความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่มด้วย bootstrap โดย
ใช้โปรแกรม FreeTree (www.natur.cuni.cz/flegr/programs/freetree.htm) และ คำนวณค่า polymorphic
Information contents (PICs)

การผสมข้ามชนิดระหว่างสบู่ดำกับพืชในสกุล *Jatropha*

เตรียมต้นสบู่ดำ สายพันธุ์ที่มีสารพิษ phorbol
ester สูงและที่มีสารพิษในปริมาณน้อยหรือไม่มีพิษ รวม 6
สายพันธุ์ สบู่แดง ฝิ่นต้น หนุมานนั่งแท่น และเข็มปัตตาเวีย
ดอกสีแดง ชนิดละ 1 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 3 ต้น ดำเนินการ
ผสมเมื่อต้นไม้ดอกออกดอก โดยการผสมในทุกคู่ผสมจะใช้สบู่ดำ
เป็นต้นแม่ โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์ดังนี้ ทำ emasculation
ก่อนดอกบาน 1-2 วัน โดยตัดดอกเพศผู้ทั้งหมดออกจากช่อ
ดอกของต้นแม่ ทำในช่วงดอกตูม คงเหลือไว้แต่ดอกเพศเมีย
คลุมดอกเพศเมียด้วยถุงผ้าตาข่ายเพื่อป้องกันแมลงมาช่วย
ผสมพันธุ์ นำอับเรณู (anther) จากต้นพ่อที่บานเต็มที่ มา
ผสมกับดอกเพศเมีย โดยป้ายละอองเรณูที่ยอดเกสรเพศเมีย
(stigma) ที่เตรียมไว้ด้วยพู่กัน ห่อหุ้มดอกที่ได้รับการถ่าย
ละอองเรณูแล้วด้วยถุงผ้าตาข่าย เมื่อเมล็ดจากการผสมแก่
เก็บเมล็ดมาปลูก ศึกษาลักษณะของลูกจากการผสมที่ได้

การตรวจสอบระดับของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ เปรียบเทียบระหว่างสับดำ เข็มปัตตาเวีย และลูกผสมรุ่น F₁ โดยเทคนิค MSAP

พืชตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ ประกอบด้วย สับดำ เข็มปัตตาเวีย ลูกผสมจาก สับดำดินเค็ม x เข็มปัตตาเวีย (F₁ 5) ลูกผสมจากสับดำ US8.45K x เข็มปัตตาเวีย (F₁ 12 & F₁ 13) ลูกผสมจากสับดำ FF25 x เข็มปัตตาเวีย (F₁ 21) ลูกผสมจากสับดำ มุกดาหาร 10 K x เข็มปัตตาเวีย (F₁ 35 & F₁ 36) และลูกผสมจากสับดำ KUBP16 x เข็มปัตตาเวีย (F₁ 47) สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP ตามวิธีการของ Kanchanaketu *et al.* (2007) โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ในขั้นตอน selective amplification ดังนี้ E+AACHM+TAA, E+AACHM+TCC, E+AACHM+TAG, E+ACGHHM+TAA, E+ACGHHM+TAG, E+ACT/HM+TGA, E+ACT/HM+TAC, E+AGT/HM+TAA, E+AAGHHM+TTG, E+AAGHHM+TAC, E+AGCHM+TGA, E+AGCHM+TGC ตรวจสอบผลผลิต PCR ใน 6% denaturing polyacrylamide gel และย้อมเจลด้วย ซิลเวอร์ไนเตรตตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) บันทึกแถบดีเอ็นเอจากชุด EcoRI+MspI และ EcoRI+HpaII ณ ตำแหน่งเดียวกันแยกเป็นคอนลวดชุด โดยบันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็น “1” และการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็น “0” จากนั้นแปลงข้อมูลดังกล่าวให้อยู่ในรูปแบบการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในรูปของ 1, 2, 3 และ 4 โดยหมายเลข 1 แทนการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในทั้งสองชุด (1-1) หมายเลข 2 แทนรูปแบบที่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏในชุด EcoRI+MspI เท่านั้น (1-0) หมายเลข 3 แทนรูปแบบที่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏในชุด EcoRI+HpaII เท่านั้น (0-1) และหมายเลข 4 แทนการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอในทั้งสองชุด (0-0) แต่ ณ ตำแหน่งเดียวกันมีแถบดีเอ็นเอปรากฏในตัวอย่างอื่น คำนวณเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอตามวิธีการของ Zhao *et al.* (2008) และ Xue-Lin *et al.* (2009) วิเคราะห์รูปแบบการเติมหมู่เมธิลด้วยวิธี principal component analysis (PCA) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc. เวอร์ชัน 2.2k (Rohiff, 2005)

การศึกษาผลการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในลูกผสมข้ามชนิด

สุ่มเลือกดอกเพศผู้ลูกผสม F₁ ระยะที่ดอกเพิ่งเสร็จสิ้นการแบ่งเซลล์ ใช้เพียงเซลล์จากอับเรณู 1 อับหรือครึ่งอับในการเตรียม 1 สไลด์ ดึงอับเรณูจากดอกเพศผู้วางบนสไลด์ หยดสี 1% acetocarmine 1 หยด ใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมตัดผ่านอับเรณูตามขวาง แล้วเขี่ยให้เซลล์หลุดออกมา คีบเศษเปลือกอับเรณูออก ปิดด้วย cover slip ใช้หัวแม่มือกดเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายและทุกๆ เซลล์ถูกกดให้อยู่ในระนาบเดียวกันบนสไลด์ ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP

สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชที่ใช้เป็นพ่อแม่ในสกุล *Jatropha* ได้แก่ สับดำ หนุมานนั่งแท่น เข็มปัตตาเวีย สับแดง ผื่นต้น และพืชที่ใช้เป็น outgroup คือ ละหุ่ง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอประมาณ 40-87 แถบ โดยรวมทุกคู่ไพรเมอร์ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 564 แถบ ซึ่งเฉลี่ยแล้วได้ 56.40 แถบ ต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบที่ให้ ความแตกต่าง (polymorphic bands) จำนวน 558 แถบ คิดเป็น 98.93 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด และแถบที่ไม่ให้ความแตกต่าง (monomorphic bands) จำนวน 6 แถบ คิดเป็น 1.07 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด ค่า PICs ของ AFLP markers ทั้งหมด มีค่าอยู่ในช่วง 0.0-0.5 ค่าเฉลี่ย PIC เท่ากับ 0.30 เมื่อคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธีของ Jaccard (1908) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.04-1.00 เมื่อนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA สามารถจำแนกตัวอย่างออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สับดำ (JC) เข็มปัตตาเวีย (JI) และหนุมานนั่งแท่น (JP) ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สับแดง (JG) และ ผื่นต้น (JM) และกลุ่มที่ 3 เป็นละหุ่ง (RC) (Figure 1) ซึ่งละหุ่งเป็นพืชในสกุล *Ricinus* จึงมีความเหมือนทางพันธุกรรมน้อยกับพืชในสกุล *Jatropha* ทั้ง 5 ชนิด โดยมีความเหมือนทางพันธุกรรมคำนวณจากลายพิมพ์ AFLP เมื่อเทียบกับพืชในสกุล *Jatropha* อื่นๆ อยู่ในช่วง 0.04-0.05

เท่านั้น เทคนิค AFLP มีข้อจำกัดที่สำคัญข้อหนึ่งคือ ไม่เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันมาก ๆ เนื่องจากความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้ อาจมีค่ามากเกินไปจนความจริงได้ (สุรินทร์, 2552) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาศึกษาสามารถจำแนก

พืชสองสกุลออกจากกันได้อย่างชัดเจน ในขณะที่พืชในสกุล *Jatropha* ที่ศึกษาสามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มโดยมีค่า bootstrap สนับสนุนการแบ่งเป็นสองกลุ่มใหญ่ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ข้อมูล 10,000 ครั้ง ค่า r ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.999

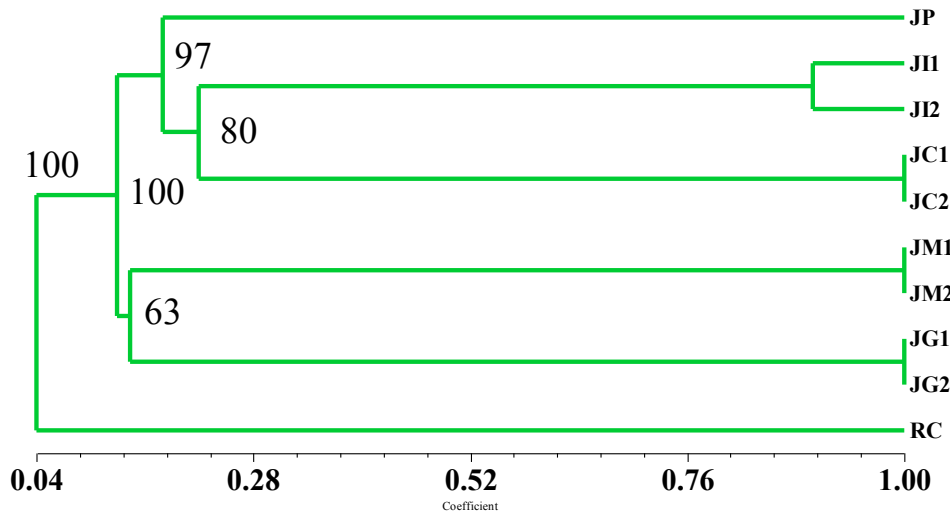


Figure 1 Phylogenetic tree of parental plants based on 564 AFLP markers constructed by UPGMA method (JP = *J. podagrica* Hook., JI = *J. integrerrima* Jacq., JC = *J. curcas* L., JM = *J. multifida* L., JG = *J. gossypifolia* L., RC = *R. communis* L. as outgroup).

ผลการจัดกลุ่มพืชในสกุล *Jatropha* พบว่าสบู่ดำมีความเหมือนกับเข็มปัตตาเวียมากที่สุด รองลงมาคือ หนุมานนึ่ง แท่น สบู่แดง และฝิ่นต้น ตามลำดับ ถึงแม้ว่า Basha and Sujatha (2009) รายงานว่าสบู่แดง (*J. gossypifolia* L.) มีความใกล้เคียงกับสบู่ดำ (*J. curcas* L.) มากกว่าเข็มปัตตาเวีย (*J. integrerrima* Jacq.) แต่ผลการทดลองครั้งนี้ก็สอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชสกุล *Jatropha* โดย Dhillon *et al.* (2009), Sudheer Pamidiamarri *et al.* (2009a) และ Sudheer Pamidiamarri *et al.* (2009b) รายงานว่า เข็มปัตตาเวีย (*J. integrerrima* Jacq.) มีความเหมือนทางพันธุกรรมกับสบู่ดำ (*J. curcas* L.) มากที่สุดในกลุ่มพืชสกุล *Jatropha* ที่นำมาศึกษา ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้การผสมข้ามชนิดระหว่างสบู่ดำและเข็มปัตตาเวีย ประสบความสำเร็จมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับคู่ผสมระหว่างสบู่ดำกับพืชในสกุล *Jatropha* ชนิดอื่น (Parthiban *et al.*, 2009)

การผสมข้ามชนิดระหว่างสบู่ดำกับพืชในสกุล *Jatropha*

จากการผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย (JC x JI) สบู่ดำกับหนุมานนึ่งแท่น (JC x JP) สบู่ดำกับสบู่แดง (JC x JG) สบู่ดำกับฝิ่นต้น (JC x JM) รวม 429 คู่ รายละเอียดแต่ละคู่ผสมดัง Table 1 มีการติดผลหรือผสมติดได้ผลจำนวน 80 ผล ได้เมล็ดทั้งหมด 149 เมล็ด เมล็ดงอก 83 ต้น ได้รับการยืนยันยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยลูกผสมมีแอลลีล ณ ตำแหน่งหนึ่งๆ จากทั้งพ่อและแม่ ประกอบลักษณะพื้นฐานที่มีลักษณะอยู่ระหว่างพ่อและแม่ จำนวน 11 ต้น (Figure 2) ส่วนใหญ่ของลูกที่ได้จากการผสมพบแต่แอลลีลของสบู่ดำที่ใช้เป็นแม่เท่านั้น จึงไม่สามารถยืนยันยืนยันความเป็นลูกผสมได้ กลไกการติดผลโดยไม่พบแอลลีลของพ่อในสบู่ดำ น่าจะได้มีการศึกษาต่อไป ในลูกผสมที่ได้รับการยืนยันยืนยันความเป็นลูกผสมดังกล่าว เป็นลูกผสม

ระหว่างสนูปด้ากับเข็มปัตตาเวีย 8 ต้น ลูกผสมระหว่างสนูปด้ากับหนุมนั่งแท่น 2 ต้น และลูกผสมระหว่างสนูปด้ากับผืนต้น 1 ต้น ลักษณะใบและดอก โดยเฉพาะลูกผสมระหว่างสนูปด้ากับเข็มปัตตาเวีย คล้ายกับผลการศึกษาของ Sujatha and Prabakaran (2003) ช่อดอกดกคล้ายเข็มปัตตาเวียแต่การติดผลน้อยกว่าสนูปด้า ต้องปรับปรุงพันธุ์โดยผสมกลับไปที่สนูปด้าต่อไป เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น ลูกผสมระหว่างสนูปด้ากับหนุมนั่งแท่น และลูกผสมระหว่างสนูปด้ากับผืนต้น ให้ดอกมีลักษณะเป็นช่อดอก ที่เมื่อปล่อยผสมเปิดหรือหน้าละของเรณูจากสนูปด้ามผสม ยังไม่ประสบความสำเร็จในการติดผล

จากการสังเกตพบว่าดอกลูกผสมจากทั้ง 2 คู่ค่อนข้างร่วงง่าย Basha and Sujatha (2009) ศึกษาการงอกของ pollen tube ระหว่างคู่ผสมข้ามชนิด พบการงอกของ pollen tube ในระหว่างการผสมพันธุ์ที่ไม่สามารถเจริญได้ตามปกติ อย่างไรก็ตามก็ยังมีรายงานความสำเร็จจากการผสมข้ามชนิดอยู่พอสมควร โดยเฉพาะที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดก็พบในคู่ผสมระหว่างสนูปด้ากับเข็มปัตตาเวียเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังได้ลูกผสมระหว่างสนูปด้ากับผืนต้น โดยใช้ผืนต้นเป็นต้นแม่ และสนูปด้าเป็นต้นพ่ออีกด้วย

Table 1 Summary of interspecific crosses in this study

Crosses	No. of flowers used in pollination	No. of fruits obtained	No. of seeds obtained	No. of germinated seeds	No. of confirmed hybrids*
JC x JI	148	36 (24.3%)	71	34 (47.9%)	8 (23.5%)
JC x JP	156	23 (14.7%)	35	29 (82.8%)	2 (6.9%)
JC x JG	62	15 (24.2%)	34	13 (38.2%)	0 (0%)
JC x JM	63	6 (9.5%)	9	7 (77.8%)	1 (14.2%)
Total	429	80	149	83	11

* No. of confirmed hybrids were the results from DNA marker analysis (not mentioned in this article)

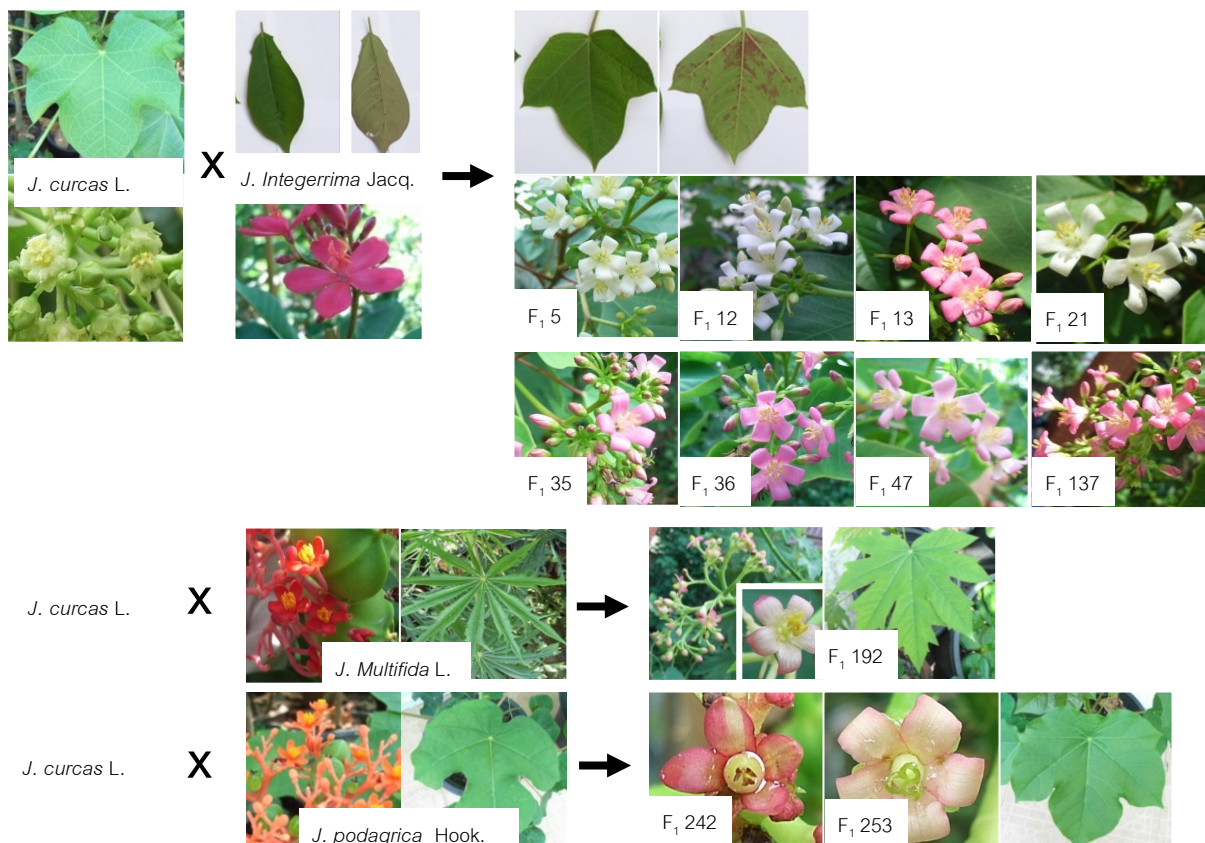


Figure 2 Flowers and leaves of parents and their derived F_1 hybrids. See color figure on the journal website.

จำนวนดอกเพศเมียในพืชมีความสัมพันธ์โดยตรงกับผลผลิต เมื่อนับจำนวนดอกเพศผู้และดอกเพศเมียของสนับดำ เข้มปัตตาเวีย และลูกผสมระหว่างพืชสองชนิดนี้พบว่า สนับดำมีอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้ประมาณ 1:14.7 ส่วนเข้มปัตตาเวียมีอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอก

เพศผู้ประมาณ 1:7 ในขณะที่ลูกผสมจากคู่นี้มีอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้ตั้งแต่ 1:9.1 ถึง 1:14.9 ซึ่งโดยภาพรวมอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้ในลูก F_1 จะมีค่าอยู่ระหว่างสนับดำและเข้มปัตตาเวีย (Table 2)

Table 2 Number of female flowers, male flowers and female/male flower ratio in F_1 hybrids from the cross between *J. curcas* L. x *J. integerrima* Jacq.

Plants	No. of inflorescence examined	No. of female flowers	No. of male flowers	Female/male flower ratio
<i>J. curcas</i> L.	5	35	516	1:14.7
<i>J. integerrima</i> Jacq.	5	16	112	1:7
F_1 5	5	34	480	1:14.1
F_1 12	7	69	875	1:12.7
F_1 13	6	38	346	1:9.1
F_1 21	12	92	1006	1:10.9
F_1 35	14	103	1538	1:14.9
F_1 36	13	105	1260	1:12
F_1 47	8	84	879	1:10.5
F_1 137	8	55	702	1:12.8

การตรวจสอบระดับของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอเปรียบเทียบระหว่างสนับดำ เข้มปัตตาเวีย และลูกผสมรุ่น F_1

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอระหว่างสนับดำ เข้มปัตตาเวีย และลูกผสมรุ่น F_1 แอปดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค MSAP ประกอบด้วยสองส่วนคือ แอปดีเอ็นเอในส่วนของการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*+*MspI* และ แอปดีเอ็นเอในส่วนของการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*+*HpaII* จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ได้แอปดีเอ็นเอทั้งหมด 625 แอปคิดเป็น 52.08 แอปต่อคู่ไพรเมอร์ เครื่องหมาย MSAP จำนวน 159 แอปเป็น monomorphic markers ในขณะที่เครื่องหมาย MSAP 466 แอป บ่งชี้การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอไม่เท่ากันระหว่างพ่อแม่และลูกผสม เมื่อแปลงข้อมูลตามรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ ได้ผลของแต่ละรูปแบบดัง Table 3 โดยพบว่ารูปแบบที่ 1 สามารถพบได้มาก

ที่สุดในทุกตัวอย่างที่ศึกษา ในขณะที่จำนวนของรูปแบบที่ 4, 2 และ 3 มีจำนวนลดลงตามลำดับ

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ จากแอปดีเอ็นเอที่ได้พบว่า สนับดำมีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลเท่ากับ 53.92% ส่วนเข้มปัตตาเวียมีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลเท่ากับ 53.12% ในขณะที่ลูกผสมทุกต้นมีเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอลดลง เมื่อเทียบกับสนับดำและเข้มปัตตาเวีย โดยเฉพาะลูกผสมหมายเลข 12 (สนับดำ US8.45K x เข้มปัตตาเวีย) มีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลน้อยที่สุดคือ 35.68% เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของการเติมหมู่เมธิลโดยวิธี PCA พบว่าลูกผสมทุกต้น มีรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลใกล้เคียงกับสนับดำมากกว่าเข้มปัตตาเวีย และลูกผสมหมายเลข 12 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลน้อยที่สุด จะกระจายตัวแยกออกจากกลุ่มลูกผสมต้นอื่นๆ อย่างชัดเจน (Figure 3)

Table 3 Pattern of MSAP fingerprints and percentage of DNA methylation among *J. curcas* L. (JC), *J. integerrima* Jacq. (JI) and their F₁ hybrids

Pattern	JC	F ₁ 5	F ₁ 12	F ₁ 13	F ₁ 21	F ₁ 35	F ₁ 36	F ₁ 47	JI
1	288	347	402	354	346	335	341	348	293
2	65	63	63	64	69	68	71	66	56
3	21	31	32	20	24	29	24	23	21
4	251	184	128	187	186	193	189	188	255
Total	625	625	625	625	625	625	625	625	625
%MET	53.92	44.48	35.68	43.36	44.64	46.40	45.44	44.32	53.12

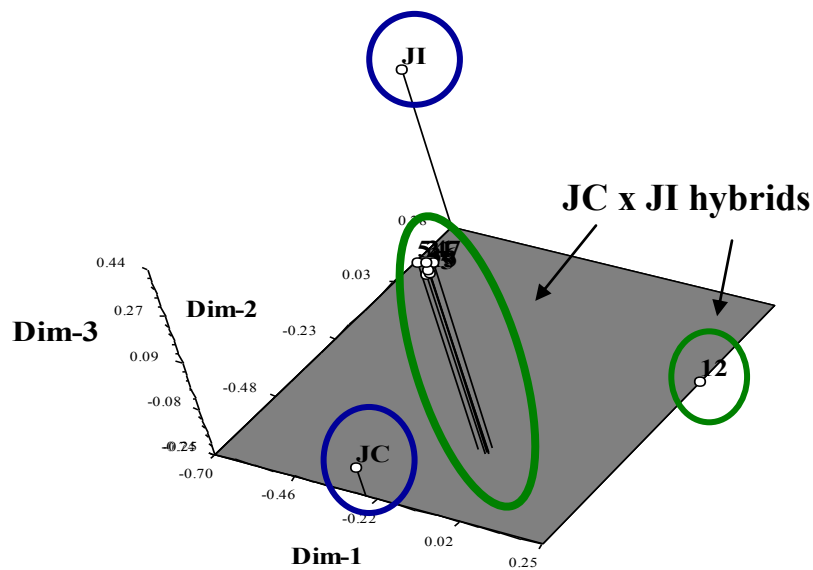


Figure 3 Principal component analysis of *J. curcas* L. (JC), *J. integerrima* Jacq. (JI) and the derived F₁ hybrids based on 625 MSAP markers

ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทิศทางตรงข้ามกับการศึกษาของ Koroma *et al.* (2011) ซึ่งศึกษาการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอใน *Xenopus laevis*, *Xenopus muelleri* และลูกผสมจากสัตว์สองชนิดนี้ โดยใช้เทคนิค MSAP พบว่าลูกผสมมีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลสูงกว่าพ่อแม่ 70.6% และสูงกว่าแม่ 64.5% ในขณะที่การศึกษาระดับการเติมหมู่เมธิลในลูกผสมฝ้ายโดย Zhao *et al.* (2008) พบว่าลูกผสมที่มีความเป็น heterosis สูง (highly heterotic hybrid) จะมีการเติมหมู่เมธิลที่น้อยกว่าลูกผสมที่มีความเป็น heterosis ต่ำ (lowly heterotic hybrid) เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ อย่างไรก็ตามการรวมกันของจีโนมต่างชนิด จากการผสม

ระหว่างชนิดหรือระหว่างสกุล รวมถึงการเกิด heterosis ในลูกผสมมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอเป็นกระบวนการทาง epigenetic มีผลตั้งแต่การควบคุมแสดงออกของยีนไปจนถึงการจัดการภายในจีโนม (genome management) กระบวนการดังกล่าวมีความแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (โชติกา, 2554) ผลการศึกษานี้บ่งชี้ได้ว่าลูกผสมของสนุ่นดำกับเข็มปัตตาเวียทุกต้นมีการเติมหมู่เมธิล น้อยกว่าพ่อแม่

การศึกษาผลการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในลูกผสมข้ามชนิด

การศึกษาผลการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในลูกผสม โดยเตรียมเซลล์จากตัวอย่างดอกเพศผู้ที่เพิ่งเสร็จสิ้นการแบ่งเซลล์ ตรวจสอบลักษณะของ tetrad ของลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างสนับดำกับเข็มปัตตาเวีย สนับดำกับฝิ่นต้น และสนับดำกับหนุมานนั่งแท่น หากไมโอซิสเป็นปกติ ก็จะมี tetrad ปกติที่มีขนาดเท่าๆ กัน ในระยะอินเตอร์เฟสก่อนเข้าสู่การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสโดยทั่วไป จะมีการเข้าคู่กันของโครโมโซม พฤติกรรมดังกล่าวเกิดได้ 3 กรณี 1) โครโมโซมสามารถเข้าคู่ เกิดรีคอมบิเนชัน และมีการแยกเป็นสองโครมาทิดได้อย่างสมบูรณ์ 2) มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมแต่ไม่มีการเกิดรีคอมบิเนชัน 3) ไม่มีการเข้าคู่กันของโครโมโซม หรือถ้าเกิดก็เกิดได้ในบางบริเวณของโครโมโซมเท่านั้น (Nasrallah *et al.*, 2000; Singh, 2003; Nicolas *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบการเข้าคู่กันของโครโมโซมกระทำได้ยาก เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็ก จึงใช้วิธีตรวจสอบผลการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส โดยพิจารณาจากลักษณะของ tetrad ในลูกผสมแทน ผลการตรวจสอบพบ tetrad ที่มีขนาดใหญ่และเล็กในบางเซลล์ของลูกผสม (Figure 4) แสดงว่าในลูกผสมมีความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเกิดขึ้น ซึ่งอาจส่งผลทำให้การติดผลของ

ลูกผสมน้อยลงเมื่อเทียบกับสนับดำ Prabakaran and Sujatha (1999) พบความผิดปกติในขนาดของ tetrad ในลูกผสมระหว่างสนับดำ (*J. curcas* L.) กับสนับแดง (*J. gossypifolia* L.) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบความผิดปกติในการเข้าคู่กันของโครโมโซม ในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของลูกผสมในพืชหลายชนิด เช่น ลูกผสมในสกุล *Helianthus* (Terzic *et al.*, 2006) ลูกผสมระหว่าง *Oryza sativa* และ *O. nivara* (Niroula *et al.*, 2009) ลูกผสมระหว่าง *Manihot esculenta* Crantz และ *M. neusana* Massar (Nassar *et al.*, 1995) ลูกผสมระหว่าง *Silene latifolia* และ *S. viscosa* (Markova *et al.*, 2006) ความไม่สมบูรณ์ในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของลูกผสม F_1 อาจมีสาเหตุมาจากความผิดปกติที่เกิดขึ้นในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส โดยในลูกผสมข้ามชนิดมักพบจำนวนเรณูที่มีชีวิตน้อย อย่างไรก็ตาม Terzic *et al.* (2006) เสนอว่าความผิดปกติที่พบในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ซึ่งเป็นสาเหตุของความไม่สมบูรณ์เพศ ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อความมีชีวิตของเรณู และการที่เรณูที่มีชีวิตมีจำนวนน้อย ก็อาจไม่เกี่ยวข้อง กับผลของการผสมข้ามชนิด

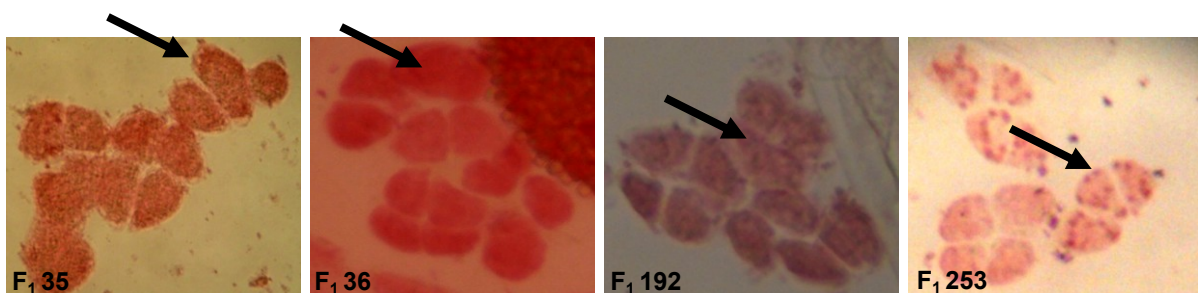


Figure 4 Meiotic study of interspecific hybridization. Abnormal tetrads were observed in meiotic cells of F_1 hybrids of *J. curcas* L. x *J. integrerrima* Jacq. (F_1 35 & F_1 36), *J. curcas* L. x *J. multifida* L. (F_1 192) and *J. curcas* L. x *J. podagrica* Hook. (F_1 253) as indicated by black arrow. See color figure on the journal website.

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Jatropha* ได้แก่ สนับดำ สนับแดง เข็มปัตตาเวีย หนุมานนั่งแท่น ฝิ่นต้น โดยมีละหุ่งเป็นพืชต่างสกุลเปรียบเทียบกับด้วยเทคนิค AFLP พบว่าสนับดำ มีความเหมือนทางพันธุกรรม

กับเข็มปัตตาเวียมากที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ คู่ผสมระหว่างสนับดำกับเข็มปัตตาเวียเป็นคู่ผสมที่ให้ผลดีที่สุด และได้จำนวนลูกผสมที่สามารถยืนยันได้ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมากที่สุด นอกจากนี้ยังได้ลูกผสมจากคู่ผสมระหว่างสนับดำกับหนุมานนั่งแท่น และสนับดำกับฝิ่นต้น โดยลูกผสม

ระหว่างสับดำกับฝิ่นต้น และสับดำกับหนุมานมั่งแพ้น ให้ข้อดอกแต่ยังไม่สามารถติดผลได้ ส่วนลูกผสมระหว่างสับดำกับเข็มปัตตาเวีย สามารถให้ดอกและติดผลได้ปานกลาง เมื่อศึกษาจำนวนดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้ในลูกผสม F_1 ระหว่างสับดำกับเข็มปัตตาเวียพบว่าอยู่ในช่วง 1:9.1 ถึง 1:14.9 ซึ่งเป็นจำนวนที่อยู่ระหว่างสับดำและเข็มปัตตาเวีย พบเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอเมื่อประเมินด้วยเทคนิค MSAP ในลูกผสมทุกต้นน้อยกว่าในพ่อและแม่ และมีแนวโน้มของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอใกล้เคียงกับสับดำมากกว่าเข็มปัตตาเวีย ผลการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในลูกผสมทั้ง 3 คู่พบ tetrad มีขนาดใหญ่และเล็กกว่าขนาดปกติ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเข้าคู่โครโมโซมต่างจีโนมที่ผิดปกติ ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมเหล่านี้จะเป็นประโยชน์กับการปรับปรุงพันธุ์สับดำต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการทุนวิจัยมหาวิทยาลัย สงข. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัยทุน สงข.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2552 และทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย ภายใต้โครงการ KU Biodiesel โครงการวิจัยเพิ่มผลผลิตของต้นสับดำเพื่อเป็นพลังงานทดแทนในอนาคต ปี 2552-2555 และจากสำนักวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2553

เอกสารอ้างอิง

ญาติวิ รัตนมณี สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล นิตยศรี แสงเดือน และ วิภา หงษ์ตระกูล. 2552. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสับดำ. *Thai J Genet* 2: 145-154.

โชติกา หยกทองวัฒนา 2554. เอพิเจเนติก-การควบคุมเหนือลำดับดีเอ็นเอ. *Thai J Genet* 4: 71-80.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. *สับดำเพื่อไบโอดีเซล*. สำนักพิมพ์มติชน กรุงเทพฯ.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร วิภา หงษ์ตระกูล นิตยศรี แสงเดือน สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล แอนนา สายมณีรัตน์ ประภา

ศรีพิจิตต์ วิเชียร กิรตินิจกาล และ เพ็ญจิตร ศรินทร์. 2550. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสับดำโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี ในการประชุมวิชาการสับดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ณ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน 29-30 พฤษภาคม 2550.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2552. *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Augustus, G.D.P.S., Jayabalan, M. and Seiler, G.J. 2002. Evaluation and bioinduction of energy components of *Jatropha curcas*. *Biomass Bioenergy* 23: 161-164.

Basha, S.D. and Sujatha, M. 2009. Genetic analysis of *Jatropha* species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organelle specific markers. *Euphytica* 168: 197-214.

Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P. 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.

Caetano-Anolles, G. 1997. Resolving DNA amplification using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, In: Micheli, R.M. and Bova, R. (eds). *Fingerprinting Methods Based on PCR*, Springer-Verlag, Heiddberg, pp. 119-134.

Dhillon, R.S., Hooda, M.S., Jattan, M., Chawla, V., Bhardwaj, M. and Goyal, S.C. 2009. Development and molecular characterization of interspecific hybrids of *Jatropha curcas* × *J. integerrima*. *Indian J Biotechnol* 8: 384-390.

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

- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vandoise des Sci Nat* 44: 223–270.
- Kanchanaketu, T., Hongtrakul, V. and Sangduen, N. 2007. Analysis of sex determination in some Cycads using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Kasetsart J (Nat. Sci.)* 41: 641–650.
- Kaushik, N., Kumar, K., Kumar, S., Kaushik, N. and Roy, S. 2007. Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. *Biomass Bioenerg* 31: 497–502.
- Koroma, A.P., Jones, R. and Michalak, P. 2011. Snapshot of DNA methylation changes associated with hybridization in *Xenopus*. *Physiol Genomics* 43: 1276–1280.
- Markova, M., Lengerova, M., Zluvova, J., Janousek, B. and Vyskot, B. 2006. Karyological analysis of an interspecific hybrid between the dioecious *Silene latifolia* and the hermaphroditic *Silene viscosa*. *Genome* 49: 373–379.
- Nasrallah, M.E., Yogeewaran, K., Snyder, S. and Nasrallah, J.B. 2000. *Arabidopsis* species hybrids in the study of species differences and evolution of amphiploidy in plants. *Plant Physiol* 124: 1605–1614.
- Nassar, H.N., Nassar, N.M.A., Vieira, C. and Saraiva, L.S. 1995. Cytogenetic behaviour of the interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and cassava, *M. esculenta* Crantz, and its backcross progeny. *Can J Plant Sci* 75: 675–678.
- Nicolas, M., Marais, G., Hykelova, V., Janousek, B., Laporte, V. and Vyskot, B. 2005. A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants. *Publ Library Sci Biol* 3: 47–56.
- Niroula, R.K., Subedi, L.P. and Upadhyay, M.P. 2009. Cytogenetic analyses of intragenomic rice hybrids derived from *Oryza sativa* L. and *O. nivara* Sharma et shastry. *Bot Res Int* 2: 227–283.
- Openshaw, H. 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenerg* 19: 1–15.
- Parthiban, K.T., Kumar, R.S., Thiyagarajan, P., Subbulakshmi, V., Vennila, S. and Rao, M.G. 2009. Hybrid progenies in *Jatropha* – a new development. *Curr Sci* 96: 815–823.
- Prabakaran, A.J. and Sujatha, M. 1999. *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja, a natural interspecific hybrid occurring in Tamil Nadu, India. *Genet Resour Crop Evol* 46: 213–218.
- Ram, S.G., Parthiban, K.T., Kumar, R.S., Thiruvengadam, V. and Paramathma, M. 2008. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol* 55: 803–809.
- Ranade, S.A., Srivastava, A.P., Rana, T.S., Srivastava, J. and Tuli, R. 2008. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. *Biomass Bioenerg* 32: 533–540.
- Rohlf, F.J. 2005. Numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYS-PC) version 2.2. User guide. *Exeter Software*, New York, USA: 31.
- Singh, R.J. 2003. *Plant Cytogenetics*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Sirisomboon, P., Kitchaiya, P., Pholpho, T. and Mahuttanyavanitch, W. 2007. Physical and mechanical properties of *Jatropha curcas* L.

- fruits, nuts and kernels. *Biosys Eng* 97: 201–207.
- Sudheer Pamidimarri, D.V.N., Chattopadhyay, B. and Reddy, M.P. 2009a. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. *Mol Biol Rep* 36: 1929–1935.
- Sudheer Pamidimarri, D.V.N., Pandya, N., Reddy, M.P. and Radhakrishnan, T. 2009b. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. *Mol Biol Rep* 36: 901–907.
- Sujatha, M. and Prabakaran, A.J. 2003. New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization. *Genet Resour Crop Evol* 50: 75–82.
- Terzic, S., Atlagic, J. and Pankovic, D. 2006. Characterization of F_1 interspecific hybrids between wild *Helianthus annuus* L. populations and cultivated sunflower. *Genetika* 36: 159–168.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acid Res* 23: 4407–4414.
- Xue-Lin, L., Zhong-Xu, L., Yi-Chun, N., Xiao-Ping, G. and Xian-Long, Z. 2009. Methylation sensitive amplification polymorphism of epigenetic changes in cotton under salt stress. *Acta Agron Hung* 35: 588–596.
- Yang, W., Yu, X., Yang, W. and Liu, B. 2011. Parental epigenetic difference in DNA methylation-level may play contrasting roles for different agronomic traits related to yield heterosis in maize. *Afr J Biotechnol* 10: 9253–9263.
- Zhao, X., Chai, Y. and Liu, B. 2007. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. *Plant Sci* 172: 930–938.
- Zhao, Y., Yu, S., Xing, C., Fan, S. and Song, M. 2008. Analysis of DNA methylation in cotton hybrids and their parents. *Mol Biol* 42: 168–178.