



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์สับดูดาโดยการผสมข้ามชนิด

Variety Improvement in *Jatropha curcas* L. by Interspecific Hybridization

นามผู้วิจัย นางสาวปกฉัตร กุศลกรรมบถ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์นิตยศรี แสงเดือน, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยการผสมข้ามชนิด

Variety Improvement in *Jatropha curcas* L. by Interspecific Hybridization

โดย

นางสาวปกฉัตร กุศลกรรมาภ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปกฉัตร กุศลกรรมบถ 2555: การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยการผสมข้ามชนิด  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภา หงษ์ตระกูล, Ph.D. 105 หน้า

ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) ระหว่างพืชในสกุล *Jatropha* ที่มีอยู่ในประเทศไทย ได้แก่ สบู่ดำ (*J. curcus* L.) สบู่แดง (*J. gossypifolia* L.) ผื่นต้น (*J. multifida* L.) หนุมานั่งแทน (*J. podagrica* Hook.) และเข็มปัตตาเวีย (*J. integerrima* Jacq.) ทั้งสายตรงและสลับพ่อแม่ และยืนยันความเป็นลูกผสมที่ได้โดยใช้ไอโซเอร์ที่ตรวจสอบลูกผสมได้รวม 20 คู่ไอโซเอร์ ได้ลูกผสม  $F_1$  ทั้งหมด 12 ต้นเป็นลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย 8 ต้น ระหว่างสบู่ดำกับผื่นต้น 2 ต้นและระหว่างสบู่ดำกับหนุมานั่งแทน 2 ต้น ลูกผสม  $F_1$  ทั้งหมดมีลักษณะระหว่างพ่อแม่ ลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวียออกดอกบ่อยต่อเนื่อง ดอกมีทั้งสีขาวหรือชมพู มีกลีบดอก 5 กลีบและติดเมล็ด ลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับผื่นต้นมีใบหยัก 7 พู ในขณะที่ลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับหนุมานั่งแทนมีใบหยัก 3-5 พูและลักษณะการเชื่อมของแผ่นใบและก้านใบเหมือนหนุมานั่งแทน ลูกผสมทั้ง 2 คู่มีใบสีเขียวและมีดอกสีชมพู แต่ไม่สมบูรณ์ไม่ติดเมล็ด แต่ไม่ได้ลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับสบู่แดง จากการศึกษาี้ ความเหมือนทางพันธุกรรมโดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค AFLP ระหว่างสบู่ดำและเข็มปัตตาเวีย สบู่ดำและหนุมานั่งแทน สบู่ดำและสบู่แดง สบู่ดำและผื่นต้น คือ 65 %, 56%, 54%และ53% ตามลำดับ ผลการย้อมเรณูลูกผสม  $F_1$  ด้วยสียคาร์มีน ให้ผลการย้อมติดสีเข้มและเรณูรูปทรงดีเหมือนพ่อแม่ แสดงความมีชีวิตของเรณูลูกผสมสูง การศึกษาการงอกของเรณูโดยใช้ fluorescence microscopy พบว่า หลอดเรณูเจริญถึงรังไข่ใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง ไม่พบการบิดเกลียวของหลอดเรณู ได้ทำการผสมกลับ (backcross) ลูกผสม  $F_1$  ที่ได้จากสบู่ดำและเข็มปัตตาเวียไปที่สบู่ดำตามลำดับ ผลการผสมได้  $BC_1$  18 ต้น  $BC_2$  100 ต้นและ  $BC_3$  20 ต้น จากการประเมินลักษณะต่างๆ ของลูกผสมกลับที่ได้และลูกจากการผสมเปิด (open pollination) จำนวน 134 ต้น และลูกจาก  $BC_1 \times F_1$  2 ต้น พบลูกผสมบางต้นมีแนวโน้มให้ผลผลิตสูง มีลักษณะลำต้นเตี้ย ออกดอกบ่อยต่อเนื่องหรือแสดงแนวโน้มของการต้านทานศัตรูพืช ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในเมล็ดลูกผสมบางต้น พบว่า ลูกผสมกลับ  $BC_1$  196\* ซึ่งมีน้ำหนักเมล็ดเบา มีน้ำมันในเฉพาะส่วนเนื้อในเมล็ด (kernel) เพียง 29.92 % และ  $BC_2$  202\* ให้ปริมาณน้ำมันในเนื้อในเมล็ดสูงสุด คือ 50.93 % การศึกษาเบื้องต้นการตอบสนองของลูกผสมต่อการให้ BA พบว่า ลูกผสมตอบสนองดีต่อการให้ BA ที่ 160 ppm โดยพบจำนวนช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อดอก จำนวนดอกเพศเมีย จำนวนดอกสมบูรณ์เพศเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน ลูกผสมที่มีลักษณะดี จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำในอนาคต

Pokchut Kusolkumbot 2012: Variety Improvement in *Jatropha curcas* L. by Interspecific Hybridization. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Assistant Professor Vipa Hongtrakul, Ph.D. 105 pages.

Variety improvement in *Jatropha curcas* L. by interspecific hybridization was performed between plants in the genus *Jatropha* available in Thailand, which were *J. curcas* L., *J. gossypifolia* L., *J. multifida* L., *J. podagrica* Hook. and *J. integerrima* Jacq. Direct and reciprocal crosses between *J. curcas* L. and the other *Jatropha* plants were conducted and the derived F<sub>1</sub> hybrids were then confirmed using 20 hybrid detecting primer pairs. Twelve F<sub>1</sub> hybrids were obtained; 8 hybrids from *J. curcas* - *J. integerrima* crossing, 2 hybrids from *J. curcas* - *J. multifida* crossing and 2 hybrids from *J. curcas* - *J. podagrica* crossing. All the confirmed hybrids had morphological characters between their parents. Hybrids from *J. curcas* L. and *J. integerrima* Jacq. continuously produced flowers with 5 petals of white or pink color and set seeds. Hybrids from *J. curcas* L. and *J. multifida* L. had leaves with 7 lobes, whereas hybrids from *J. curcas* L. and *J. podagrica* Hook. had leaves with 3-5 lobes and joining site between petiole and leaf blade as same as *J. podagrica* Hook. The hybrids of both pairs had green leaves and pink flowers, but were not fertile. No hybrid from the cross between *J. curcas* L. and *J. gossypifolia* L. was obtained from this study. Genetic similarities based on AFLP DNA fingerprints between *J. curcas* L. and *J. integerrima* Jacq./ *J. podagrica* Hook./ *J. gossypifolia* L./ *J. multifida* L. were 65%, 56%, 54% and 53%, respectively. The carmine staining of the F<sub>1</sub> pollens resulted in dark-stained and well-formed pollens, indicating high pollen viability of F<sub>1</sub> hybrids. Pollen germination study using fluorescence microscopy showed that the pollen tube reached the ovary within 2-4 hours. No twisted pollen was observed. Serial backcrossing of F<sub>1</sub> hybrids from *J. curcas* L. and *J. integerrima* Jacq. to *J. curcas* L. was performed resulting 18 BC<sub>1</sub>, 100 BC<sub>2</sub> and 20 BC<sub>3</sub> were obtained. Morphological characters of all the derived backcross plants were evaluated in 134 plants from open pollination and 2 hybrids from BC<sub>1</sub> x F<sub>1</sub> and the results indicated that some plants showed potential for high yield. In addition, plants with continuous flower production or with resistance to pests were also observed. For seed oil contents evaluation in some hybrids, BC<sub>1</sub>196\* with light seed weight contained only 29.92% oil content in kernel, while BC<sub>1</sub>202\* gave the highest oil content at 50.93%. Preliminary study of the hybrid response to BA application was performed and found that the hybrids gave a good response to BA at 160 ppm. The number of inflorescence, female flowers and perfect flowers were significantly increased in the BA treated plants. The hybrids with good performance will be useful for *J. curcas* L. improvement project in the future.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล ประธานกรรมการ  
ที่เป็นผู้ริเริ่มและมีส่วนในงานวิจัยนี้อย่างมากอีกทั้งการให้คำปรึกษาในการวิจัยของข้าพเจ้าตลอดมา  
รวมถึงตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นิตยศรี  
แสงเดือน กรรมการ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำและเสียสละเวลาเพื่อข้าพเจ้า และขอกราบขอบพระคุณ  
ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานการสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกพร ไตร  
วิทยากร ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความ  
สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สุขสันต์ สุทธิผล ไพบุลย์ และ คุณพิชัย มณี โชติ สำหรับพันธุ์  
สบู่ดำ

ขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอนและถ่ายทอดความรู้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) ที่ให้การสนับสนุนเงินวิจัย ภายใต้โครงการ  
ความร่วมมือระหว่าง บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
(KU Biodiesel-PTT) ในการวิจัยและพัฒนาเพิ่มผลผลิตของต้นสบู่ดำเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทดแทน  
ในอนาคต ปี 2552-2554

ขอขอบคุณคุณจิตติ กาญจนเกตุ คุณญาติวี รัตนมณี และคุณศิรินันท์ สุวรรณน้อยและสมาชิก  
ห้องปฏิบัติการ 4511 สำหรับความช่วยเหลือต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัวของข้าพเจ้าที่ได้เสียสละและสนับสนุน  
ข้าพเจ้า ในเรื่องของเวลา กำลังทรัพย์ และทุกสิ่งทุกอย่างจนสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณพระผู้เป็นเจ้าสำหรับพรและความช่วยเหลือที่ได้รับจากพระองค์

ปกฉัตร กุศลกรรมบถ

กรกฎาคม 2555

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	43
สรุปและข้อเสนอแนะ	91
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	94
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	105

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อพ่อแม่พันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ผสมพันธุ์ จำนวน 43 ตัวอย่าง	26
2	ไพโรมอร์จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน	33
3	ไพโรมอร์จำเพาะกับพันธุ์พืชในสกุล <i>Jatropha</i> ที่พัฒนาจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค AFLP	34
4	ลำดับเบสของไพโรมอร์และ Adapter ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ AFLP เพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่ใช้เป็นพ่อแม่ลูกผสม $F_1$ และลูกผสมกลับ	37
5	สรุปผลการผสมสายตรง (direct cross) ข้ามชนิด ระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย/ หนุมานนั่งแท่น/ ฝิ่นต้น/ สบู่แดง และลูกผสมที่ได้	46
6	สรุปผลการผสมสายสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) ข้ามชนิด ระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย/ หนุมานนั่งแท่น/ ฝิ่นต้น/ สบู่แดง และลูกผสมที่ได้	47
7	สรุปผลการผสมกลับ (backcross) รุ่นที่ 1	55
8	สรุปผลการผสมกลับ รุ่นที่ 2 และ 3 ( $BC_2$ และ $BC_3$ )	59
9	ลักษณะสบู่ดำและลูกผสมที่มีลักษณะดี	71
10	ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน 14 ตัวอย่าง	76
11	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูพ่อแม่และลูกผสม	81
12	รายชื่อตัวอย่างที่ใช้ศึกษาการเจริญของหลอดเรณู	83
13	ไพโรมอร์ที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชที่นำมาผสมลูก $F_1$ ลูกผสมกลับ และลูกที่ได้จากการผสมเปิด โดยเทคนิค AFLP และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากแต่ละคู่ไพโรมอร์	87
14	รายชื่อพืชที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP	98

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ตัวอย่างพืชในสกุล <i>Jatropha</i> ที่ใช้ในการผสมข้ามชนิด	43
2	genomic DNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนพืชที่ใช้ศึกษา	44
3	ลูกผสม $F_1$ สับดูดำกับเข็มปัตตาเวียจำนวน 8 ต้น	47
4	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่าง สับดูดำ (แม่) กับ เข็มปัตตาเวีย (พ่อ) จากการใช้เทคนิค SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน <i>FATA</i>	48
5	ลูกผสม $F_1$ สับดูดำกับฝิ่นต้นและฝิ่นต้นกับสับดูดำ สับดูดำกับหนุมนนึ่งแทน	50
6	การตรวจสอบความเป็นลูกผสม $F_1$ ระหว่างสับดูดำ (แม่) กับ หนุมนนึ่งแทน (พ่อ) กับฝิ่นต้น (พ่อ) และ ฝิ่นต้น (แม่) กับ สับดูดำ โดยเทคนิค SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน <i>FATA</i>	50
7	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่าง สับดูดำ (แม่) กับ สับดูแดง (พ่อ) และ สับดูแดง (แม่) กับ สับดูดำ (พ่อ) โดยเทคนิค SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน <i>KASII</i>	52
8	แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างลูกจากการผสมระหว่างสับดูแดง (แม่) กับสับดูดำ (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับสับดูดำ JC 63-1 และ JC 2-1	53
9	ลูกผสมกลับ ( $BC_1$ ) ระหว่างสับดูดำ (แม่) กับ $F_1$ (สับดูดำ-เข็มปัตตาเวีย) (พ่อ)	55
10	ลูกผสมกลับ ( $BC_1$ ) ระหว่าง $F_1$ (สับดูดำ-เข็มปัตตาเวีย) (แม่) กับ สับดูดำ (พ่อ)	56
11	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมกลับระหว่างสับดูดำ (แม่) กับ $F_1$ สับดูดำ-เข็มปัตตาเวีย (พ่อ) และ $F_1$ สับดูดำ-เข็มปัตตาเวีย (แม่) สับดูดำ (พ่อ) จากการใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน <i>FATA</i>	57
12	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมจากการผสมกลับ (backcross) ระหว่างสับดูดำ (แม่) กับ $F_1$ สับดูดำ-เข็มปัตตาเวีย (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับ สับดูดำ JC 63-1 และ JC 2-1	58
13	ลูกผสมกลับ ( $BC_2$ ) ระหว่าง สับดูดำ-เข็มปัตตาเวีย	61
14	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของตัวอย่างลูกจากการผสมกลับ ( $BC_2$ ) สับดูดำ (แม่) กับ $BC_1$ (พ่อ) และ $BC_1$ (แม่) กับ สับดูดำ (พ่อ) โดยใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน <i>FATA</i>	61

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างลูกจากการผสมกลับ (backcross) ระหว่าง สนุ่นดำ (แม่) กับ ลูกผสม BC <sub>1</sub> สนุ่นดำ-เข้มแดง (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับ เข็มปัดตาเวีย JI 1.1B3	63
16	แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างลูกจากการผสมกลับ (backcross) ระหว่าง สนุ่นดำ (แม่) กับ ลูกผสม BC <sub>1</sub> สนุ่นดำ-เข้มแดง (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับ เข็มปัดตาเวีย JI 250 และ JI 161	64
17	แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างลูกจากการผสมกลับ (backcross) ระหว่างสนุ่นดำ (แม่) กับ ลูกผสม BC <sub>1</sub> สนุ่นดำ-เข้มแดง (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับเข็มปัดตาเวียต่างๆ	64
18	ลูกที่ได้จากการผสมเปิด (open pollination)	68
19	การตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากการปล่อยผสมเปิด (OP) ของ BC <sub>1</sub> และอื่นๆ จากการใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน <i>FATA</i>	70
20	ลูกผสมกลับ (BC) และลูกผสมเปิด (OP) ที่มีลักษณะเด่น	74
21	ผลการให้สาร BA แก่พืชเบื้องต้น	78
22	เรณูเข็มปัดตาเวียหลังข้อมด้วยอะซีโตคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์	79
23	เรณูหนุมนานั่งแท่นหลังข้อมด้วยอะซีโตคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์	80
24	เรณูสนุ่นดำหลังข้อมด้วยอะซีโตคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์	80
25	เรณูลูกผสม F <sub>1</sub> ระหว่างสนุ่นดำกับเข็มปัดตาเวีย หลังข้อมด้วยอะซีโตคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์	81
26	ละอองเรณูจำนวนมากบนยอดเกสรเพศเมียเริ่มออกหลอดละอองเรณูภายใน หลังการผสม 30 นาที	83
27	หลอดละอองเรณูตกลงมาในก้านเกสรเพศเมียและรังไข่ ใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง	84
28	ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชที่นำมาผสมและลูกผสมที่ได้	89

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
29	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูป phylogenetic tree ของพืชที่นำมาผสมและลูกผสมที่ได้ ได้แก่ สบู่ดำ สบู่แดง ผีนตั้น หนุมานนั่งแท่น เข็มปัตตาเวีย และลูกผสม $F_1$ , $BC_1$ , op $BC_1$ , op $F_1$ , op $F_2$ ของสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย โดยใช้ UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc-2.20 โดยอาศัยข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก เทคนิค AFLP	90
30	การกระจายของตัวอย่างในรูป 3 มิติจากการวิเคราะห์ Principal Component Analysis ของพืชที่นำมาผสม ได้แก่ สบู่ดำ สบู่แดง ผีนตั้น หนุมานนั่งแท่น เข็มปัตตาเวียและลูกผสม $F_1$ , $BC_1$ , op $BC_1$ , op $F_1$ , op $F_2$ ของสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย ที่วิเคราะห์ด้วย โปรแกรม NTSYSpc-2.20k โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิค AFLP	90

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
PCR	=	polymerase chain reaction
PICs	=	Polymorphic Information Contents
FATA	=	acyl-ACP thioesterase
F <sub>1</sub>	=	Filial 1
KASII	=	beta-ketoacyl-ACP synthase II
SCAR	=	sequence characterized amplified region
SSCP	=	single stranded conformation polymorphism
T <sub>a</sub>	=	annealing temperature
T <sub>m</sub>	=	melting temperature
ml	=	milliliter
μl	=	microlitre
g	=	gram
mg	=	milligram
mM	=	millimolar
pM	=	picomolar

## การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำโดยการผสมข้ามชนิด

### Variety Improvement in *Jatropha curcas* L. by Interspecific Hybridization

#### คำนำ

ประเทศไทยต้องนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้เกือบทั้งหมดทำให้ต้องสูญเสียเงินตราในการนำเข้าน้ำมันดิบปีละหลายแสนล้านบาทและเพิ่มขึ้นทุกปี ถ้าลดปริมาณนำเข้าน้ำมัน ก็จะประหยัดเงินตราของประเทศและทำให้การขาดดุลการค้าลดลงและลดการเพิ่มราคาของสินค้า ซึ่งมักจะเพิ่มขึ้นเมื่อราคาน้ำมันเพิ่มขึ้นและจะไม่ลดลงเมื่อราคาน้ำมันลดลง วิกฤตการณ์นี้มีมาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันดีเซล กองทุนน้ำมันเชื้อเพลิงต้องใช้เงินกองทุนสำรองไว้เพื่อไม่ให้ผู้บริโภคร้อนรนมากนัก นอกจากนี้ เชื้อเพลิงจากพลังงานที่ได้จากการทับถมของพืชและสัตว์นับวันจะลดน้อยลงและคาดว่าจะหมดไปจากโลก ตลอดจนการใช้ น้ำมันเชื้อเพลิงจากการเผาไหม้ของฟอสซิล ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและบรรยากาศเกิดภาวะเรือนกระจก (ชำนานู และคณะ, 2549)

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่มีสรรพคุณหลายด้าน มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในหลายภาคของประเทศไทย และเนื่องจากปัจจุบันนี้มีความต้องการใช้น้ำมันเป็นพลังงานอย่างมากและประเทศไทยเองก็ไม่สามารถผลิตน้ำมันได้ต้องนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศซึ่งมีการปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง รัฐบาลจึงส่งเสริมให้มีการผลิตและใช้ไบโอดีเซลที่เป็นผลผลิตการเกษตรทดแทนน้ำมันดิบที่ต้องนำเข้า สบู่ดำจึงเป็นอีกพลังงานทางเลือกหนึ่ง ซึ่งมีศักยภาพในการใช้เป็นพลังงานทดแทน (Sirisomboon *et al.*, 2007; Ranade *et al.*, 2008) เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเชื้อเพลิงใกล้เคียงกับดีเซลหลายประการ ใช้เดินเครื่องยนต์ทำให้การเผาไหม้สมบูรณ์ สะอาด ไม่พบซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในการเผาไหม้และไม่เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและมีข้อได้เปรียบเหนือพืชน้ำมันชนิดอื่นเช่นปาล์มน้ำมันในด้านระยะเวลาในการให้ผลผลิตโดยสบู่ดำจะให้ผลผลิตตั้งแต่ปีแรกขณะที่ปาล์มน้ำมันจะใช้เวลามากกว่า ราคาสบู่ดำนั้นก็ไม่น่าแพงมากนักเพราะไม่ได้ขึ้นอยู่กับราคาตลาดโลกเหมือนปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มยังใช้บริโภคเป็นอาหาร ปัญหาใหญ่ของสบู่ดำคือ ให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำและการสุกแก่ของผลสบู่ดำไม่พร้อมกัน จึงเป็นเหตุผลให้มีการวิจัยเพื่อพัฒนาพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตมากขึ้น จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของสบู่ดำเบื้องต้น พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ (ศิริศักดิ์และคณะ, 2550; Kaushik *et al.*, 2007; Pamidiamarri *et al.*, 2008; Ram *et al.*, 2007; Ranade *et al.*,

2008) ทำให้เกิดแนวคิดที่ว่าสนุ่นดำอาจมีฐานพันธุกรรมแคบ จึงอาจส่งผลให้แนวทางการปรับปรุงพันธุ์สนุ่นดำด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) อาจประสบความสำเร็จได้ยาก เนื่องจากหากพันธุกรรมของสนุ่นดำมีความใกล้เคียงกันมาก โอกาสที่จะได้ลักษณะใหม่ๆ จากการผสมก็จะน้อยมากตามไปด้วย จากเหตุผลดังกล่าวจึงน่าจะพิจารณาแนวทางการพัฒนาสายพันธุ์สนุ่นดำให้มีผลผลิตสูง โดยการขยายฐานพันธุกรรมของสนุ่นดำให้กว้างขึ้นเช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีต่างๆรวมทั้ง การผสมข้ามกับพืชในกลุ่มอื่น ทั้งข้ามชนิด (interspecific hybridization) และข้ามสกุล (intergeneric hybridization)

ในการศึกษานี้จะได้ผสมพืชข้ามชนิดในสกุล *Jatropha* ที่มีในประเทศไทย ระหว่างสนุ่นดำ (*J. curcus* L.) กับ สนุ่นแดง (*J. gossypifolia* L.) สนุ่นดำกับตีนตัน (*J. multifida* L.) สนุ่นดำกับหนุมนั่งแท่น (*J. podagrica* Hook.) และสนุ่นดำกับเข็มปัดตาเวีย (*J. integerrima* Jacq.) ทั้งผสมสายตรงและสายสลับพ่อแม่และผสมกลับเพื่อขยายฐานพันธุกรรมสนุ่นดำ ปลูกตรวจสอบลูกผสม ยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชสกุล *Jatropha* ลูกผสม F<sub>1</sub> และลูกผสมกลับด้วยเทคนิค AFLP เพื่อสร้าง phylogenetic tree แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ดีที่มีแนวโน้มให้ผลผลิตสูง และ/หรือมีลักษณะดีนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณน้ำมัน ศึกษาความมีชีวิตและการงอกของหลอดเรณู เพื่อการปรับปรุงพันธุ์และพัฒนาสายพันธุ์สนุ่นดำโดยใช้สารเคมีเพิ่มจำนวนโครโมโซมกรณีเป็นหมันหรือการผสมกลับต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. ผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) ระหว่างสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) กับ สบู่แดง (*Jatropha gossypifolia* L.) สบู่ดำกับฝิ่นต้น (*Jatropha multifida* L.) สบู่ดำกับหนุมานนึ่ง แทน (*Jatropha podagrica* Hook.) และสบู่ดำกับเข็มปัดตาเวีย (*Jatropha integerrima* Jacq.) ทั้งผสมสายตรงและสลับพ่อแม่
2. ตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ DFLP และ SSCP markers
3. การศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) และ การเจริญของหลอดเรณู (pollen tube growth/germination)
4. ปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมที่ได้โดยการผสมกลับ (backcross) ไปยังสบู่ดำ ตรวจสอบความเป็นลูกผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและศึกษาลักษณะลูกผสมกลับ เปรียบเทียบกับลูก  $F_1$  และพ่อแม่
5. ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชที่นำมาผสม ได้แก่ สบู่ดำ สบู่แดง ฝิ่นต้น หนุมานนึ่งแทน เข็มปัดตาเวีย ลูก  $F_1$  และลูกจากการผสมกลับ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP

## การตรวจเอกสาร

### 1. ประวัติความเป็นมาของสบู่ดำ

สบู่ดำ เป็นพืชที่นำเข้ามาสู่ประเทศไทยในสมัยปลายกรุงศรีอยุธยา โดยชาวโปรตุเกส และ ยังแพร่หลายไปสู่ประเทศอื่นๆ ในเอเชีย ซึ่งแต่ละ ประเทศก็จะเรียกชื่อต่างกัน อย่างชาวมาลายู จะเรียกว่า Dutch castor oil ตามประวัติศาสตร์ที่สมัยนั้น ฮอลันดาเข้าครอบครองมาลายู ส่วนที่เกาะ ชวา นั้นรู้จักกันในชื่อของ Chinese castor oil ตรงคำว่า oil นี้เองที่ทำให้เห็นว่า สบู่ดำในยุคนี้ปลูก เพื่อใช้ประโยชน์ ในการนำมาผลิตไปบีบอัดน้ำมันและจุดไฟให้แสงสว่างในเวลากลางคืน ในขณะที่ สงครามโลกครั้งที่ 2 นั้นชาวบ้านเกิดความลำบากมากด้วยว่ามีเงินก็ไม่สามารถหาซื้อน้ำมัน ก๊าซได้ ชาวบ้านในชนบทจึงแก้ปัญหาด้วยการนำเมล็ดสบู่ดำมาแกะเอาเนื้อสีขาวข้างในเสียบเรียงกัน ด้วย ก้านมะพร้าว หรือ ไม้ไผ่เหลาแหลม ใช้จุดไฟให้แสงสว่างหรือตำเมล็ดให้ละเอียดใส่กระบอกไม้ไผ่ ใช้เส้นด้ายดิบเป็นไส้ จุดเทียนไขได้เป็นอย่างดีหรือทำเป็นเทียนพรรษาตามเทศกาลต่างๆ (ชำนานู และคณะ, 2549)

เมล็ดสบู่ดำมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 35 ของน้ำหนักเมล็ด น้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดสบู่ดำ สามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลกับเครื่องจักรกลทางการเกษตรได้อย่างดี โดยไม่ต้องใช้ส่วนผสม และไม่ทำให้เครื่องยนต์เสียหายและยังสามารถผสมกับน้ำมันเบนซินตามอัตราส่วน ที่พอเหมาะ ใช้ เติมน้ำมันเครื่องยนต์เบนซินได้ (จเร, 2527) เมล็ดสบู่ดำ 4 กิโลกรัมสามารถสกัดน้ำมันได้ 1 ลิตร หาก เมล็ดสบู่ดำที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมีปริมาณไนโตรเจนสูง ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการ จึง สามารถนำไปเป็นปุ๋ยอินทรีย์ของพืชได้ส่วน ลำต้น ผล และเมล็ดจะมีกรด hydrocyanic และมี สารพิษ curcin ในเมล็ด สบู่ดำสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเมล็ด ปักชำและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สำหรับประเทศไทย เรื่องของไบโอดีเซล โดยเฉพาะ สบู่ดำ ได้มีการวิจัยกันมาตลอด ช่วงเวลา 20 ปีที่ผ่านมา แม้จะสะดุดเพราะความที่ยังไม่เห็นถึงความสำคัญในยามที่ราคาน้ำมันยังอยู่ในภาวะที่รับมือไหว ถึงแม้จะยอมรับกันแล้วว่าสบู่ดำสามารถนำมาเป็นไบโอดีเซลได้ กระทั่ง ปี 2543 ราคาน้ำมันเริ่มขยับตัวสูงขึ้น สบู่ดำ จึงถูกจับมาปิดฝุ่นอีกครั้ง แต่ในระยะแรกนี้มีต้นสบู่ดำ เหลืออยู่น้อย จึงต้องพยายามส่งเสริมให้มีการปลูกตามที่ว่างเปล่า หรือที่ที่ปลูกพืชแล้วให้ผลผลิต น้อย ทั้งคันทาริมรั้วบ้าน หัวไร่ปลายนา สองข้างถนนระหว่างหมู่บ้าน ขอให้เป็นกลางแจ้งแฉด จัด 'ไม่อยู่ได้รวมเงาไม้ใหญ่' (ระพีพันธ์ และ สุขสันต์, 2525)

## 2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุล *Jatropha* ในประเทศไทย

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) หรือ physic nut/ purging nut อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae พืชในวงศ์ (family) นี้มีประมาณ 321 สกุล 8,000 ชนิด (species) มีพืชเศรษฐกิจ เช่น ยางพารา hevea (*Hevea brasiliensis* Muell Arig.) มันสำปะหลัง cassava (*Manihot esculentas* Crantz.) และละหุ่ง castor bean (*Ricinus communis* L.) ไม้ผล เช่น มะขาม star goodsberry (*Phyllanthus acidus* L.) และ มะไฟ mafia (*Buccaurea ramflio* Lour.) และพืชพลังงานที่เป็นพืชน้ำมัน เช่น มะเขย tung trees (*Aleurite* sp.) ไชนีสแทลโล Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*) และสบู่ดำ physic nut (*Jatropha curcas* L.) (พรชัย, 2549)

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามภูมิภาค ภาคเหนือเรียก มะหุ้งฮั่ว ภาคอีสาน เรียก หมากเขย มะเขย และภาคใต้เรียก มะหุ้งเทศหรือละหุ้งเทศ มีถิ่นกำเนิดใน เม็กซิโก และอเมริกากลาง มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 22$  (Soontornchainaksaeng and Jenjittikul, 2003) มีลักษณะทั่วไปดังนี้ เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ (large shrub) หรือยืนต้นขนาดเล็ก (small tree) ชอบแสงแดดจัด อายุมากกว่า 20 ปี อาจถึง 50 ปี เป็นพืชทิ้งใบในฤดูแล้ง ทนทานต่ออากาศร้อน แห้งแล้ง และดินเลว ชอบดินทรายที่มีการระบายน้ำดี ไม่ชอบที่ลุ่มน้ำขัง ลำต้นเมื่อยังอ่อนมีเปลือกบางสีค่อนข้างเขียว ลำต้นเมื่อแก่เป็นปล้อง (articulated growth) เปลือกหนาสีน้ำตาล มีรอยตา (leaf scar) ปรากฏตามส่วนยาวของลำต้น ลำต้นอ่อน กิ่ง และก้านใบมีน้ำยางสีขาวขุ่น ลำต้นแก่มีน้ำยางเฉพาะที่เปลือก (bark) น้ำยางเมื่อละลายน้ำเกิดเป็นฟองคล้ายสบู่ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปหัวใจ กว้างถึงรูปโล่ คล้ายๆ ใบฝ้ายและใบพุทตาลแต่หนากว่า เพราะมีไข (cutin) เคลือบอยู่ที่ผิวใบ ขอบใบเรียบ มีรอยหยักเว้าเป็น 5 พู พูข้างปลายมน พูปลายหรือพูกกลางรูปหัวใจปลายแหลม การจัดเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบร่างแห (palmately netted venation) ขนาดของใบมีความกว้างประมาณ 18 เซนติเมตร มีความยาวประมาณ 16 เซนติเมตร ก้านใบยาวประมาณ 24 เซนติเมตร สบู่ดำมักทิ้งใบในฤดูร้อน ถ้าแห้งแล้งมากจะทิ้งใบทั้งต้น ออกดอกบริเวณซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ลักษณะเป็นช่อคล้ายช่อเชิงหลั่น มักออกเป็นคู่ๆ ช่อยาวได้ถึง 12 เซนติเมตร ก้านช่อยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ดอกย่อยแยกเพศ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่แยกกัน แต่อยู่ภายในช่อเดียวกัน เป็นดอกไม้สมบูรณ์เพศ ดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉก รูปไข่ เกมขอบขนาน สีเหลืองแกมเขียว กว้าง 1.5 มิลลิเมตร ยาว 3 มิลลิเมตร โดยประมาณ ปลายกลม ด้านในมีขนยาวห่าง มีต่อมน้ำหวานที่โคนกลีบด้านใน เกสรเพศผู้มี 10 อัน แบ่งออกเป็น 2 วง วงนอกแยกจากกัน วงในเชื่อมติดกันอัด

เรณูยาว 1.5 มิลลิเมตร สีเหลือง ดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าดอกเพศผู้อยู่กลางของช่อย่อย กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉกยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร ลักษณะอื่นคล้ายดอกตัวผู้ กลีบดอกรูปขอบขนานแกมรี สีเขียวอ่อน มีเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน 10 อัน สีขาว รังไข่รูปกระสวยมี 3 พู ปลายก้านมียอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 2 แฉก อัตราส่วนดอกเพศผู้ : ดอกเพศเมีย ประมาณ 7:1 ปริมาณดอกย่อยประมาณ 70-100 ดอกต่อช่อ แต่จะติดผล 7-15 ผลเท่านั้น ผลค่อนข้างป้อมหรือเป็นรูปกระสวย กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร ลักษณะเป็นแบบเปลือกแข็ง (nut) มี 3 พู (lobe) ผลอ่อนสีเขียวและเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเมื่อแก่จัดผลนอกที่เป็นสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ผลแห้งที่ยังติดอยู่บนต้นจะไม่แตกออก แต่เมื่อผลร่วงลงสู่บนพื้นดินอาจแตกได้ ผลสดหนึ่งผลมีน้ำหนักประมาณ 15 กรัม ผลแห้งน้ำหนักจะลดลงเหลือ 2.6 กรัม ผลเมื่อแกะผนังด้านนอก (exocarp) และผนังชั้นกลาง (mesocarp) ออก จะพบผนังชั้นใน (endocarp) สานกันเป็นชั้นหุ้มเมล็ดภายในไว้หนึ่งผลมีจำนวนเมล็ด 2-3 เมล็ด แต่ส่วนมากพบว่ามี 3 เมล็ด เมล็ดรูปร่างป้อมยาว (oblong) รูปกระสวยแกมขอบขนานแบนข้างกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1.7 เซนติเมตร เปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ จัดเป็นพวกมีเชื้อหุ้มเมล็ด (albuminous seed) โดยเชื้อ (albumin) บ่อยู่ภายใน เป็นที่เก็บสะสมน้ำมัน (oil) และสารเคอร์ซิน (curcin) ส่วนของเนื้อใน (endosperm) และคัพภะ (embryo) มีสีขาว แต่ละเมล็ดมีน้ำหนักประมาณ 0.6 กรัม (ชานาญ, 2549; ปรัชญา, 2537; พิชัย และ วัฒนา, 2552; Augustus *et al.*, 2002; Kaushik *et al.*, 2007; Openshaw, 2000; Sirisomboon *et al.*, 2007)

ประโยชน์ สบู่ดำเป็นพืชที่มีประโยชน์ใช้สอยมากที่สุดชนิดหนึ่งในพืชสกุลนี้ ประโยชน์หลักคือน้ำมันเชื้อเพลิงใช้ในการหุงต้มและเดินเครื่องยนต์ดีเซล เมล็ดสบู่ดำ มีน้ำมันประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นน้ำมันจากเนื้อในเมล็ด (kernel) ประมาณ 45-60 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันสบู่ดำมีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันที่อิ่มตัว (saturated fatty acid) ประมาณ 21.14 เปอร์เซ็นต์ และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) 78.86 เปอร์เซ็นต์ กรดไขมันที่อิ่มตัวส่วนใหญ่เป็นกรด Palmitic (14:0) และ Stearic (18:0) กรดไขมันไม่อิ่มตัวส่วนใหญ่เป็นกรด Oleic (18:1) และ Linoleic (18:2) น้ำมันสบู่ดำมีค่าความร้อนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันดีเซล No. 1 และมีค่าซีเทน (cetane) ใกล้เคียงค่าต่ำสุดของน้ำมันดีเซล มีค่าความหนืด (viscosity) ที่ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 41.87 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่น้ำดีเซลมี 3.06 หรือสูงกว่าประมาณ 13.68 เท่าของน้ำมันดีเซล ปัญหาหลักของน้ำมันสบู่ดำจึงขึ้นอยู่กับความหนืด การลดค่าความหนืดลงสามารถทำให้น้ำมันสบู่ดำใช้กับเครื่องจักรกลการเกษตรได้โดยตรง การเปลี่ยนรูปน้ำมัน โดยวิธี transesterification เป็นรูป methyl หรือ methyl ester สามารถลดขนาดของโมเลกุลน้ำมัน สบู่ดำลงได้มาก ทำให้การเผาไหม้ในกระบอกสูบเกิดได้สมบูรณ์ขึ้น โดยที่น้ำมัน สบู่ดำประกอบด้วยกรดไขมันที่เป็นไฮโดรคาร์บอนที่เป็นโซ่ตรงและยาวเหมือนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นโซ่ตรงยาวและอิ่มตัวในน้ำมันดีเซล

จึงทำให้น้ำมัน สบู่ดำเหมาะสมที่จะใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้ ประโยชน์อื่นๆของสบู่ดำยังมีอีกมากมาย ทั้งประโยชน์โดยตรงและที่เป็นผลพลอยได้ เช่น ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค โดยใช้เป็นยาระบายหรือยาถ่าย ใช้รักษาโรคผิวหนังหรือปวดตามข้อ กากสบู่ดำที่เหลือจากการบีบน้ำมันแล้ว มีสารประกอบไนโตรเจนสูง เช่นเดียวกับกากละหุ่งที่บีบน้ำมันออกแล้ว หรือมูลไก่ จึงทำปุ๋ยอินทรีย์ได้ดี นอกจากนี้ ต้น กิ่ง ก้าน เปลือก ใบ และราก สบู่ดำยังใช้ทำปุ๋ยอินทรีย์ได้เช่นเดียวกับกากส่วนกากหรือเมล็ด กรณีผ่านกระบวนการกำจัดพิษแล้ว นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ได้ ปัจจุบันมีพันธุ์สบู่ดำที่ปราศจากสารพิษในประเทศเม็กซิโกและได้มีการนำมาปลูกในประเทศไทยแล้ว นอกจากนี้ยังสามารถใช้สบู่ดำเป็นสารป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช น้ำยางสบู่ดำนำไปทำน้ำมัน ทาสี ทาหมึกพิมพ์ ต้นสบู่ดำใช้ปลูกเป็นรั้วกันสัตว์ ป้องกันลม และป้องกันการชะล้างหน้าดิน ลำต้น กิ่ง ก้าน ใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวมวล และ ประโยชน์อื่นๆ เช่น ทำเอื่อกระดาษ ไม้อัด ทำน้ำส้มควันไม้ เป็นต้น (ชำนาญ, 2549; ปรัชญา, 2537; พิชัย และ วัฒนา, 2552)

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ สบู่แดง

สบู่แดง (*Jatropha gossypifolia* L.) หรือ belly-ache bush ภาคกลางเรียกอีกชื่อว่า ละหุ่งแดง ภาคใต้มักเรียกว่า สบู่เลือด สีหลอด และหงษ์เทศ มีถิ่นกำเนิดในอเมริกากลางไปจนถึงอเมริกาใต้ และแคริบเบียน มีจำนวน โครโมโซม  $2n = 22$  (Soontornchainaksaeng and Jenjittikul, 2003) มีลักษณะ โดยทั่วไปดังนี้ เป็น ไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง เล็กกว่าสบู่ดำ ไม้ทิ้งใบ (evergreen) ลำต้น โดยทั่วไปทั้งความสูงและความกว้างของทรงพุ่มมีขนาดใกล้เคียงกัน เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มเฉลี่ยประมาณ 1.5 เมตร สีเปลือกของลำต้นเมื่ออายุยังน้อยมีสีแดงอมม่วงเป็นมันเงา ผิวเรียบและอวบน้ำ เมื่อแก่มีสีน้ำตาล ลำต้นและกิ่งมีน้ำยาง ลำต้นแก่จะมีน้ำยางเฉพาะที่เปลือกเช่นเดียวกับสบู่ดำ ใบ เมื่อแก่เป็นแผ่นใบรวม (palmately compound leaf) มีรอยหยัก (lobe) ลึกประมาณ 3-5 หยัก รอยหยักลึกกว่าในสบู่ดำ มีขนาดเล็กๆ ละเอียด (ciliate) ขึ้นปกคลุมตามแนวขอบใบ โคนใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) ปลายใบแหลม (acute) ใบอ่อนมีสีม่วงแดง เป็นมันเงาเมื่อเจริญเต็มที่ใบเปลี่ยนเป็นสีม่วงอมเขียว และสีเขียวใบไม้ในที่สุด เส้นใบมีสีม่วงอมแดง (red purple) เห็นชัดเจนด้านหน้าใบ มากกว่าด้านหลังใบ เส้นใบมีการจัดเรียงแบบ palmately netted venation ขนาดใบยาวเฉลี่ย 16-18 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 12-15 เซนติเมตร ใบของสบู่แดงมีส่วนของก้านใบยาวเชื่อมติดกับส่วนของลำต้นหรือกิ่งคล้ายสบู่ดำ ก้านใบยาวเฉลี่ยประมาณ 15-16 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางยาวประมาณ 0.4-0.5 เซนติเมตร ก้านใบสบู่แดงจะมีขน (ciliate) ตลอดความยาว ตำแหน่งที่อยู่ของใบจะอยู่สลับกัน (alternate) คล้ายสบู่ดำออกดอกบริเวณปลายกิ่ง หรือข้างๆ ยอดเช่นเดียวกับสบู่ดำ ลักษณะช่อดอกเป็นช่อประกอบแบบกระจุก (compound dichasium) เช่นเดียวกับสบู่ดำ เป็น

ดอกไม่สมบูรณ์เพศ (imperfect flower) มีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันแต่อยู่ในต้นเดียวกัน (monoecious) กลีบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อนมีจำนวน 5 กลีบ กลีบดอกมีสีแดงสดมีจำนวน 5 กลีบเท่ากัน ดอกเพศผู้มีอับเรณูเป็นสี่เหลี่ยม 8 อับ แบ่งเป็น 2 วง วงนอกมี 5 อับ วงในมี 3 อับ ดอกเพศเมีย ประกอบด้วย รังไข่และเกสรเพศเมีย รังไข่เป็นแบบ superior ovary รังไข่แบ่งเป็น 3 ห้อง ก้านช่อดอกหนึ่งมีจำนวนดอก 10-15 ดอก ติดผล 2-4 ผล ผลรูปรียาวรี (oblong) เปลือกบาง ภายในผลมี 3 ห้อง เช่นเดียวกับสบู่ดำ แต่มีขนาดเล็กกว่า ความยาวประมาณ 1.4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 1.3 เซนติเมตร โดยทั่วไปผลมีขนาดเล็กและจำนวนติดผลต่อช่อมากกว่าสบู่ดำ ผลแก่จัดสีของเปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมน้ำตาล ผลแห้งมีน้ำหนักประมาณ 0.4 กรัม จัดเป็นผลแบบแตก (dehiscent fruit) เมื่อผลแก่จะแตกคุดออกจากเมล็ดได้เอง รากเป็นระบบรากแก้ว หรือรากปฐมภูมิ ร่วมกับรากแขนงเช่นเดียวกับสบู่ดำ มักใช้เป็นไม้ประดับ ผลมีขนาดเล็กกว่าสบู่ดำ ขนาดใกล้เคียงกับละหุ่ง เมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อนสลับขาว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 0.8 เซนติเมตร (พิชัย และ วัฒนา, 2552)

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของฝิ่นต้น

ฝิ่นต้น (*Jatropha multifida* L.) หรือ coral bush ภาคกลางเรียกอีกชื่อว่า มะละกอฝรั่ง ภาคเหนือเรียก มะหุ่งแดง มีถิ่นกำเนิดในเม็กซิโก ถึงบราซิล มีจำนวน โครโมโซม  $2n = 22$  (Sontornchainaksaeng and Jenjittikul, 2003) มีลักษณะโดยทั่วไปดังนี้ เป็นไม้พุ่มยืนต้น ขนาดกลาง เล็กกว่าสบู่ดำ ไม้ทั้งใบ (evergreen) หรือกึ่งทั้งใบ (semi-deciduous) สูงประมาณ 1.8-6 เมตร ทนแล้งปานกลาง ลำต้นมีสีเขียว เปลือกบางเมื่อยังอ่อน เมื่อแก่จัดมีสีเขียวปนน้ำตาล จนถึงสีน้ำตาล เปลือกหนา ใบเมื่อแก่เป็นแผ่นใบรวมแยกเป็นแฉกๆ ตัด 9 แฉก (palmately cut leaf) ปลายแหลม ยาว 7-11 เซนติเมตร แต่ละแฉกยังแยกเป็นแฉกย่อยๆ ใต้ใบมีสีขาว ดอกเป็นช่อสีแดงสดใส (blight coral red) กลีบแผ่เมื่อบาน ก้านดอกสั้นแต่ก้านช่อดอกยาว ช่อดอกทรงแฟลททอป (flat topped cluster) ออกดอกบริเวณปลายก้าน ลักษณะช่อดอกเป็นช่อประกอบแบบกระจุก (compound dichasium) เป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ มีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันแต่อยู่ในช่อดอกเดียวกัน (monoecious) ดอกเพศผู้และเพศเมียมีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก 5 กลีบเท่าๆ กัน กลีบเลี้ยงมีสีเหลืองอ่อน กลีบดอกมีสีแดงเข้ม ดอกเพศผู้มีอับเรณูสี่เหลี่ยม 8 อับ แบ่งเป็น 2 วง วงนอกมี 5 อับ วงในมี 3 อับ ดอกเพศเมียมีรังไข่เหนือวงกลีบ (superior ovary) ที่ปลายรังไข่มียอดเกสรเพศเมีย (stigma) แยกออกเป็นแฉกๆ มีลักษณะผลเป็นสามเหลี่ยม แบ่งเป็น 3 พู ผลเริ่มแก่มีสีเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีดำ ผลมีขนาดใหญ่เท่าๆ สบู่ดำหรือใหญ่กว่า รากเป็นระบบรากแก้ว หรือรากปฐมภูมิร่วมกับราก

แขนงเช่นเดียวกับสบู่ดำ มักใช้เป็นเป็นไม้ประดับ เมล็ดเมื่อแก่ด้านนอกมีเปลือกสีดำ ด้านในมีเนื้อสีขาว ขนาดใกล้เคียงกับสบู่ดำ (พิชัย และ วัฒนา, 2552)

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหนุมานนั่งแท่น

หนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica* Hook.) หรือ buddha belly plant มีชื่อเรียกอื่นอีกว่า วานเลียด และ หัวตะมานนั่งแท่น มีถิ่นกำเนิดในอเมริกากลาง ฮอนดูรัส นิการากัว มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 22$  (Soontornchainaksaeng and Jenjittikul, 2003) มีลักษณะโดยทั่วไปดังนี้ เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง เป็นพืชไม่ทิ้งใบ (evergreen) ลำต้นป่องตรงกลางหรือโคน (caudiciform bush) สูงประมาณ 1.5 เมตร ชอบแสงแดดจัดถึงมีร่มเงา ทนแล้งปานกลาง ใบเมื่อแก่มีขนาดใหญ่มากกว่าสบู่ดำ เป็นแผ่นใบรวม (palmately compound leaf) แบ่งเป็น 5 แฉก แต่ละแฉกมีปลายแหลมเป็นติ่ง (cuspidate) ออกดอกตลอดปี ดอกจะตกในฤดูร้อน ดอกเป็นช่อสีแสดจัด กลีบแผ่เมื่อบาน ก้านดอกสั้นแต่ก้านช่อดอกยาวพองๆ กับก้านใบ ช่อดอกทรงแฟลททอป (flat topped cluster) คล้ายๆ ฝิ่นต้น ออกดอกบริเวณปลายก้าน ลักษณะช่อดอกเป็นช่อประกอบแบบช่อกระจุกซ้อน (compound dichasium) เป็นดอกไม้สมบูรณ์เพศ มีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันแต่อยู่ในช่อดอกเดียวกัน (monoecious) ดอกเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะคล้ายดอกฝิ่นต้น ดอกเพศผู้มีอับเรณูสีเหลือง 8 อับ แบ่งเป็น 2 วง วงนอกมี 5 อับ วงในมี 3 อับ ดอกเพศเมียมีรังไข่เหนือวงกลีบ (superior ovary) ที่ปลายรังไข่มียอดเกสรเพศเมีย (stigma) แยกออกเป็นแฉกๆ ส่วนผลก่อนข้างกลมมีขนาดใกล้เคียงผลสบู่แดง มี 3 ห้อง เปลือกผลบางเมล็ดมีขนาดเล็กใกล้เคียงผลสบู่แดง เปลือกสีน้ำตาล เนื้อสีขาว รากเป็นระบบรากแก้ว หรือรากปฐมภูมิร่วมกับรากแขนงเช่นเดียวกับสบู่ดำ น้ำยางสีขาวข้น (ขุ่น) พบมากในส่วนของลำต้นอ่อนและใบเช่นเดียวกับสบู่ดำ ประโยชน์ที่ใช้ทำสีแสดในเม็กซิโก และสหรัฐอเมริกาตะวันตก นำไปปลูกเป็นไม้ประดับ (พิชัย และ วัฒนา, 2552)

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเข็มปัตตาเวีย

เข็มปัตตาเวีย (*Jatropha integerrima* Jacq.) หรือปัตตาเวีย หรือ peregrina/ spicy *Jatropha* มีถิ่นกำเนิดในเวสต์อินดีส (West Indies) เป็นที่รู้จักดีในประเทศคิวบา และรัฐฟลอริดาตอนใต้ มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 22$  (Soontornchainaksaeng and Jenjittikul, 2003) มีความต้านทานต่อการกัดกินของศัตรูพืช (Lakshminarayana and Sujatha, 2001) ทนแล้ง และมีปริมาณกรด Linoleic สูง (Rao and Lakshminarayana, 1987) เป็นพืชที่มีแนวโน้มว่าเป็นตัวเชื่อมระหว่างสกุล *Jatropha* และสกุล *Ricinus* (Sujatha, 1996) มีลักษณะโดยทั่วไปดังนี้ เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดเล็ก (small tree) เป็น

พืชไม้มทั้งใบ (evergreen) ลำต้นกลม เปลือกเมื่อยังอ่อน มีสีเขียว เมื่อแก่มีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลปนดำ มีเนื้อไม้แข็ง ไม้มีน้ำยาง ลำต้นสูงประมาณ 3 เมตร มีขนาดเล็กกว่าสบู่ดำ ทนแล้ง ใบเป็นมันเงา รูปร่างแตกต่างกัน ส่วนใหญ่เป็นรูปขอบขนานแกมรูปไข่ (ovate-oblong) หรือรูปรี (elliptic) ปลายใบแหลม (acute) ขอบใบเรียบ ดอกเป็นช่อ เมื่อบานแผ่เป็นรูปดาว (star shaped) ออกดอกตลอดทั้งปีมี 2 พันธุ์ (พันธุ์ดอกสีแดง และพันธุ์ดอกสีชมพู) ออกดอกที่ปลายยอด ปลายกิ่ง หรือระหว่างกิ่ง กับใบเช่นเดียวกับสบู่ดำ ดอกเป็นช่อแบบกระจุก (compound dichasium) เป็นดอกไม้สมบูรณ์เพศ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันแต่อยู่ในช่อดอกเดียวกัน (monoecious) ดอกเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะคล้ายหนุมนั่งแท่นหรือฝิ่นต้น แต่มีช่อดอกต่างกันตรงที่มีก้านดอกยาวกว่าและมีช่วงการจัดเรียงห่างกว่าช่อดอก จึงไม่เป็นทรงแฟลททอป ดอกเพศผู้มีอับเรณู 8 อับ จัดเรียงคล้ายหนุมนั่งแท่นหรือฝิ่นต้น แต่สูงขึ้นมาในระดับสูงกว่า ผลค่อนข้างกลมมีขนาดเล็กกว่าสบู่ดำ แต่ใกล้เคียงสบู่แดง มี 3 ห้อง เปลือกผลบาง รากเป็นระบบรากแก้ว หรือรากปฐมภูมิร่วมกับรากแขนงเช่นเดียวกับสบู่ดำ ใช้เป็นไม้ประดับ (พิชัย และ วัฒนา, 2552)

สบู่ดำเป็นพืชพลังงานที่มีศักยภาพในการใช้เป็น พลังงานทดแทน (Sirisomboon *et al.*, 2007; Ranade *et al.*, 2008) และมีข้อได้เปรียบเหนือพืชน้ำมันชนิดอื่นเช่นปาล์มน้ำมันในด้านระยะเวลาในการให้ผลผลิตโดยสบู่ดำจะให้ผลผลิตตั้งแต่ปีแรก และปลูกได้แม้ในพื้นที่ไม่อุดมสมบูรณ์ แห้งแล้ง ขณะที่ปาล์มน้ำมันจะใช้เวลานานกว่าจะเก็บผลผลิตได้ และเป็นพืชที่ต้องการน้ำที่พอเพียง นอกจากนี้ น้ำมันปาล์มยังใช้บริโภคเป็นอาหาร หากนำน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นพลังงานทดแทน จะเป็นการแย่งตลาดน้ำมันเพื่อการบริโภค สบู่ดำมีข้อเสียคือให้ผลผลิตต่ำ การดูแลของเมล็ดไม่พร้อมกันเป็นปัญหาต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิต จึงเป็นเหตุผลให้มีการวิจัยเพื่อพัฒนาพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตมากขึ้น จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของสบู่ดำเบื้องต้น พบว่าสบู่ดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ (ศิริศักดิ์และคณะ, 2550; Kaushik *et al.*, 2007; Pamidiamarri *et al.*, 2008; Ram *et al.*, 2007; Ranade *et al.*, 2008) ทำให้เกิดแนวคิดว่าสบู่ดำอาจมีฐานพันธุกรรมแคบ จึงอาจส่งผลให้แนวทางการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) อาจประสบความสำเร็จได้ยาก เนื่องจากหากพันธุกรรมของสบู่ดำมีความใกล้เคียงกันมาก โอกาสที่จะได้ลักษณะใหม่ๆ จากการผสมก็จะน้อยมากตามไปด้วย จากเหตุผลดังกล่าวจึงน่าจะพิจารณาแนวทางการพัฒนาสายพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตสูงโดยการขยายฐานพันธุกรรมของสบู่ดำให้กว้างขึ้นเช่น การผสมข้ามกับพืชในกลุ่มอื่น รวมทั้งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีต่างๆ

### 3. การผสมพันธุ์พืช (hybridization)

การผสมพันธุ์พืชมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้เกิดขึ้นในประชากรพืช เปิดโอกาสให้นักปรับปรุงพันธุ์ได้คัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีที่สุดจากการรวม (recombination) ยีนที่มีลักษณะดีเข้าไว้ด้วยกัน การผสมพันธุ์พืชอาจแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

การผสมภายในพืชชนิดเดียวกัน (intraspecific hybridization) เป็นการผสมภายในพืชสปีชีส์เดียวกัน เช่น การผสมระหว่างถั่วเหลือง พันธุ์ จ.5 กับ Williams และการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ พวงนาค 16 กับ ซิกาติส เป็นต้น ซึ่งเป็นการผสมระหว่างถั่วเหลือง (*Glycine max*) และระหว่างข้าว (*Oryza sativa*) ชนิดเดียวกันแต่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันเท่านั้น

การผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) เป็นการผสมข้ามสปีชีส์ เช่น การผสมพันธุ์ระหว่าง *Gossypium herbaceum* กับ *G. raimondii* หรือการผสมพันธุ์ผักกาด กะหล่ำ เช่น *Brassica oleracea* กับ *B. campestris* เป็นต้น การผสมพันธุ์ประเภทนี้ส่วนใหญ่มีวัตถุประสงค์ เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะพิเศษ เช่น ต้านทานโรคและแมลง หรือทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ซึ่งความสำเร็จของการสร้างลูกผสมข้ามชนิดเหล่านี้ จะขึ้นอยู่กับจำนวนโครโมโซมของพืชที่ใช้เป็นคู่ผสม ถ้ามีความแตกต่างกันมากก็จะยิ่งผสมได้ยากขึ้น อย่างไรก็ตามความก้าวหน้าทางวิทยาการที่ทันสมัยต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงอับเรณู การเพาะเลี้ยงคัพภะ การหลอมรวมเซลล์ และการใช้พันธุวิศวกรรม จะมีส่วนช่วยให้ประสบความสำเร็จได้มากขึ้น

การผสมข้ามสกุล (intergeneric hybridization) เป็นการผสมข้ามสกุล (genus) ของพืช เช่น การผสมระหว่างข้าวสาลีกับข้าวไรย์ (*Triticum aestivum* X *Secale cereale*) การผสมข้ามสกุลนี้จะยากกว่าการผสมข้ามชนิด เพราะจำนวนและขนาดของโครโมโซมที่แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามพืชที่มีวิวัฒนาการร่วมกันมา หรือพืชที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางสายเลือด (related species) จะประสบความสำเร็จได้มากกว่า นอกจากนี้แล้วการนำความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง เช่น การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการสร้างลูกผสมชนิดนี้ให้ประสบความสำเร็จได้มากขึ้น (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2527)

การผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) ในพืชสกุล *Jatropha* โดยธรรมชาติ ได้ถูกรายงานโดย Prabakaran and Sujatha (1999) พบใน รัฐทมิลนาดู (Tamil Nadu State) ประเทศอินเดีย โดยลูกผสม *J. tanjorensis* Ellis & Saroja ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่าง *J. curcas* L. and

*J. gossypifolia* L. ลักษณะของลูกผสมที่ได้อยู่ระหว่างพ่อและแม่ ทั้งสีดอก สีลำต้น และรูปร่างใบ และมีการเจริญเติบโตเร็ว รวมทั้งถูกยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้ข้อมูลรูปแบบของเอนไซม์ Peroxidase การผสมระหว่าง *J. curcas* L. และ *J. gossypifolia* L. แสดงระดับการไม่เข้ากัน (incompatibility) สูง การศึกษาโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในลูกผสม แสดงการแบ่งเซลล์ผิดปกติ พบ trivalents และ univalents ในระยะ metaphase I และการแบ่งโครโมโซมที่ไม่เท่ากันในระยะ anaphase รวมทั้งพบ sporads ที่ผิดปกติด้วยขนาดที่ไม่เท่ากัน ซึ่งแสดงถึงการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสที่ผิดปกติ จากการข้ามเรณู (pollen) แสดงความหลากหลายของรูปแบบ (polymorphism) และแสดงความเป็นหมัน ลูกผสมที่ได้ไม่ติดเมล็ดแต่มีความสวยงามใช้ปลูกเป็นรั้ว และไม้ประดับ ต่อมา Sujatha and Prabakaran (2003) สร้างลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *J. curcas* L. และ *J. integririma* Jacq. ที่มีลักษณะระหว่างลักษณะพ่อและแม่ แต่แนวโน้มไปทางลักษณะของแม่ และมีสีดอกที่แตกต่างกันเด่นชัดคือ ชมพูเข้ม ชมพูอ่อน และขาว ลูกผสมที่ได้สามารถให้ผล แต่การพัฒนาของเมล็ดไม่เป็นปกติ เมื่อนำลูกผสมที่ได้ไปผสมกลับ (backcross) กับ *J. curcas* L. พบการกระจายของสีดอกตั้งแต่สีแดงเข้ม เขียว ไปถึงขาว และเพิ่มความสมบูรณ์ของ pollen เพิ่มการติดผล นอกเหนือจากการเพิ่มคุณค่าในการเป็นไม้ประดับด้วยสีดอกที่สวยงามสดใส ความเป็นลูกผสมยังได้ถูกยืนยันโดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Dhillon *et al.* (2009) ได้ผสมสบู่ดำ กับ เข้มแดง ทั้งแบบผสมแบบตรงและแบบสลับ จากการใช้สบู่ดำเป็นแม่และเข้มแดงเป็นพ่อพบว่าลักษณะของลำต้น ขนาดและรูปร่างของใบลูกผสมนั้น มีความคล้ายคลึงกับแม่ส่วนสีของใบและดอก ขนาดของผลและเมล็ดมีความโน้มเอียงไปทางพ่อ พ่อแม่และลูกผสมทั้งหมดถูกนำไปตรวจสอบโดยเทคนิค RAPD เพื่อยืนยันความเป็นลูกผสม ปัจจุบันนิยมยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ประกอบลักษณะฟีโนไทป์ที่ปรากฏ เนื่องจากให้ผลแม่นยำเป็นการยืนยันในระดับดีเอ็นเอซึ่งเป็นตัวการควบคุมลักษณะที่ปรากฏทั้งหมด และไม่ผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม Gedil *et al.* (2009) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิด ได้แก่ RAPD, SSR (Simple Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) และ STS (Sequence Tag Site) ที่จำเพาะกับจีโนมอ้อย (cassava, *Manihot esculenta* Crantz) และจีโนมมะहु่ง (castor bean, *Ricinus communis* L.) เพื่อการตรวจสอบลูกผสมระหว่าง อ้อย และ มะहु่ง รวมทั้งการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA content) ด้วย flow cytometry สามารถยืนยันได้ว่าลูกที่ได้เป็นลูกผสมหรือไม Basha and Sujatha (2009) ได้สร้างลูกผสมและใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับนิวเคลียสและออร์แกเนล (nuclear and organelle specific markers) ยืนยันความเป็นลูกผสมระหว่างพืชในสกุล *Jatropha*

ในการศึกษานี้จะได้ผสมพืชข้ามชนิด (interspecific hybridization) ในสกุล *Jatropha* ที่มีในประเทศไทย ระหว่างสบู่ดำกับสบู่แดง สบู่ดำกับฝิ่นต้น สบู่ดำหนุมนั่งแท่น และสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย ทั้งผสมสายตรงและสายสลับพ่อแม่เพื่อขยายฐานพันธุกรรมสบู่ดำ ระหว่างพืชทั้งหมดในสกุล *Jatropha* ที่มีในประเทศไทย Pamidiarrari *et al.* (2008) รายงานความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) จากเทคนิค RAPD ระหว่างสบู่ดำกับสบู่แดง สบู่ดำกับฝิ่นต้น สบู่ดำกับหนุมนั่งแท่น สบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย คือ 0.46, 0.46, 0.49 และ 0.63 ตามลำดับ และเมื่อใช้เทคนิค AFLP ได้ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 0.45, 0.44, 0.42 และ 0.55 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า สบู่ดำกับเข็มปัตตาเวียมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด น่าจะประสบความสำเร็จในการผสมข้ามพันธุ์มากที่สุด ประกอบกับข้อมูลการศึกษาของ Parthiban *et al.* (2009) รายงานการงอกของเรณู (pollen germination) ภายหลังการป้าย pollens ของสบู่ดำ สบู่แดง ฝิ่นต้น หนุมนั่งแท่น และเข็มปัตตาเวีย บน stigmas ของสบู่ดำ และตรวจสอบการงอกของ pollen tubes ภายใต้วัยกล้องจุลทรรศน์ พบเปอร์เซ็นต์การงอกของ pollens ระหว่าง สบู่ดำกับสบู่ดำ สบู่ดำกับสบู่แดง สบู่ดำกับฝิ่นต้น สบู่ดำกับหนุมนั่งแท่น สบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย คือ 82.4, 48.59, 15.60, 32.96 และ 50.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย pollen tubes ในบางคู่ไม่สามารถงอกไปถึง ovary ได้อย่างไรก็ตามหากทำการผสมในปริมาณมากน่าจะมีโอกาสได้ลูกผสมจากการผสมคู่ต่างๆ โดยลักษณะเด่นที่เป็นที่ต้องการ (desirable traits) จากพืชแต่ละชนิด (Basha and Sujatha, 2009; Parthiban *et al.*, 2009) พอสรุปได้ดังนี้

สบู่ดำ	คุณค่าทางเชื้อเพลิง (fuel rating/ energy value) 39.6-41.8 MJ/kg มีปริมาณน้ำมันสูง (30-50 เปอร์เซ็นต์, เฉพาะ kernel 45-60 เปอร์เซ็นต์) ทนความแห้งแล้ง (drought resistant)
สบู่แดง	มีระยะตั้งท้องสั้น ผลแก่เร็ว (short gestation period) คุณค่าทางพลังงาน 42.2 MJ/kg ต้านทานต่อเพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง ไรศัตรูพืช และหนอนกินใบ ทนเค็ม (tolerant to salinity) ทนความแห้งแล้ง ไม่ผลัดใบ ให้ผลดก
ฝิ่นต้น	มีปริมาณน้ำมันสูง คุณค่าทางพลังงานสูงสุด 57.1 MJ/kg ไม่ไวแสง ไม่ผลัดใบ ผลแก่ไม่แตกระเบิด (non-dehiscent capsules) เก็บเมล็ดได้ไม่สูญเสีย
หนุมนั่งแท่น	เป็นไม้ดอกไม้ประดับ ปรับตัวเข้ากับสภาพแห้งแล้ง ได้ดี ไม่ไวแสง ไม่ผลัดใบ ต้านทานต่อโรคโคนเน่า (resistance to fusarial wilt)

เข็มปัตตาเวีย ปรับตัวเข้ากับสภาพแห้งแล้งได้ดี ด้านทานต่อศัตรูพืช หนอนกินใบ  
ไม่วางแสง ไม่ผลัดใบ ลำต้นลักษณะกึ่งไม้เนื้อแข็ง (semi-hard wood stem)

#### 4. การติดผลและปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

ถ้าไม่มีเรณูตกลงบนยอดเกสรเพศเมียหรือมีน้อยมาก ทำให้พืชไม่มีกระบวนการงอกของ  
หลอดเรณูเข้าไปผสมกับอวุล (ovule) เมื่อไม่มีกระบวนการถ่ายเรณูจึงไม่มีการติดผลเกิดขึ้น ดอกที่  
ได้รับการถ่ายเรณูตามธรรมชาติพบว่าการติดผลน้อยมากเมื่อเทียบกับดอกที่ได้รับการช่วยถ่ายเรณู  
(รมย์ริณู, 2537ก) การงอกของเรณูเป็นการนำน้ำเชื้อเพศผู้เข้าผสมกับอวุลและเกิดการปฏิสนธิขึ้น  
พบว่า อุนทุมที่มีสูงหรือต่ำเกินไปจะมีผลทำให้การติดผลลดลงได้ ความสามารถในการงอกจะ  
ลดลงมากถ้าอยู่ในสภาพที่มีอุนทุมที่สูงกว่า 37-38 องศา หรือต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส (พีระเดช,  
2529) สาเหตุที่การงอกเรณูขึ้นอยู่กับอุนทุมมีขณะที่ยังงอกนั้น เนื่องจากมีกระบวนการทำงานของ  
เอนไซม์ มีการสังเคราะห์ RNA และ โปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว มีการหายใจสูงขึ้น และเกิดการ  
สังเคราะห์สารประกอบต่างๆ (Leopold and Kreidemann, 1975) ดังนั้นถ้าอุนทุมไม่เหมาะสมต่อ  
การทำงานของเอนไซม์จะมีผลต่อประสิทธิภาพของการงอกของเรณู นอกจากอุนทุมที่มีสูงหรือต่ำ  
เกินไปจะมีผลต่อการทำงานของแมลงที่ช่วยถ่ายเรณูอีกด้วย การมีความชื้นสัมพัทธ์สูง อับเรณูมีการ  
แตกต่ำลง เนื่องจากมีการสูญเสียน้ำจากเซลล์น้อย (รัตนาวรรณ, 2532) ซึ่งใน faba bean การถ่ายเรณู  
และการปฏิสนธิ มีความแปรปรวนมากเนื่องจากอิทธิพลของฤดูกาล สภาพพื้นที่และ genotype ที่  
ต่างกัน สภาพเกษตรเพศเมียมีช่วงเวลาที่พร้อมจะรับการถ่ายเรณูเป็นระยะเวลาสั้นหรือพร้อมที่จะรับ  
การถ่ายเรณูก่อนที่อับเรณูจะแตกเป็นสาเหตุให้ประสิทธิภาพการถ่ายเรณูลดลง การติดผลน้อย  
(Spencer and Kennard, 1956) ออวุลที่ไม่สมบูรณ์ในรังไข่ทำให้ไม่สามารถรับการปฏิสนธิเป็นผล  
ให้ ไม่มีการพัฒนาและเจริญเติบโตเป็นผลที่สมบูรณ์ (ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี, 2539) ความเข้ากัน  
ได้ (compatibility) ระหว่างเกสรเพศผู้และเพศเมีย ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัย โดยในพืชบางชนิดแม้จะมี  
เกสรเพศผู้และเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกันหรือต้นเดียวกันก็ตามแต่ไม่อาจเกิดการถ่ายเรณูภายในต้น  
เดียวกันได้ เนื่องจากธรรมชาติของพืชนั้นมีระบบป้องกันการผสมตัวเอง ต้องผสมข้ามเท่านั้น  
เพื่อที่จะได้ลูกที่มีความแข็งแรง (พีระเดช, 2529) ความสมบูรณ์ของต้น ถ้าต้นที่มีความสมบูรณ์สูงก็  
ย่อมมีการติดผลที่ดีกว่าต้นที่ไม่สมบูรณ์และมีคาร์โบไฮเดรตเพียงพอต่อการเจริญของผล  
(Schneider, 1977) เมื่ออยู่ในระยะออกดอกและติดผล ทิศทางการเคลื่อนที่ของอาหารจะย้ายไปอยู่ที่  
ดอกและผลมากขึ้น (Hanson and Breen, 1985)

## 5. การศึกษาการเจริญของหลอดเรณู

การงอกของหลอดเรณูและการเจริญของหลอดเรณูมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการปฏิสนธิของพืช และเทคนิคย้อมแสงเรืองสีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้มาหลายปีเพื่อศึกษาปัญหาการถ่ายเรณูที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์ โดย Martin (1959) เป็นคนแรกที่ใช้เทคนิคย้อมสีเรืองแสงศึกษาการเจริญของหลอดเรณูภายในก้านเกสรเพศเมียในพืชหลายชนิด เทคนิคที่ใช้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่มี callose ภายในหลอดเรณู ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเรณู (Heslop-Harrison, 1968) และเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งที่ไม่พบในเกสรเพศเมีย สามารถย้อมติดสี aniline blue แล้วสามารถเรืองแสงเมื่อส่องด้วยแสงสีน้ำเงินหรือแสงอุลตราไวโอเล็ตโดยมีการเรืองแสงเป็นระยะหรือเป็นเส้นยาวสีเหลืองหรือเขียวอมเหลือง ตัดกับก้านเกสรเพศเมียที่ทึบแสงทำให้สามารถติดตามการเจริญของหลอดเรณูได้จนถึงการปฏิสนธิ

เทคนิคการย้อมสีเรืองแสงนี้ใช้ศึกษาในด้านต่างๆ Ravestijn (1969) ศึกษาการติดผลของมะเขือเทศ พริกและสตรอเบอรี่ ใช้ศึกษาการการผสมตัวเองไม่ติดของกะหล่ำ (*Brassica oleracea* L.) เกิดจากหลอดเรณูไม่สามารถเจริญลงไปในก้านเกสรเพศเมียได้ (Kho and Baer, 1968) ใช้การศึกษาความเข้ากันไม่ได้ระหว่าง *Rhododendron* 2 สายพันธุ์ พบการเกิดหลอดเรณูเมื่อถึงรังไข่แล้วปลายจะม้วนงอไม่เข้าไปถึงอวูล ใช้ศึกษาการผสมตัวเองไม่ติดของ *Acacia retioses* Schles.var *uncifolia* จะเกิดขึ้นเมื่อหลอดเรณูหยุดการเจริญเมื่อไปถึงเนื้อเยื่อชั้นที่ 1 หรือชั้นที่ 2 ของ nucellus (Kho and Baer, 1970) ใช้ศึกษาการผสมตัวเองไม่ติดของ sour cherry (*Prunus cerasus* L.) เกิดจากการเจริญของหลอดเรณูถูกยับยั้งในบริเวณของก้านเกสรเพศเมีย (Lansati and Lezzoni, 1990) เช่นเดียวกับการผสมตัวเองไม่ติดของ white clover (*Trifolium repens* L.) และสามารถใช้ตรวจสอบ white clover ที่เกิดการผสมตัวเองไม่ติด (Babik et al., 1982) การผสมตัวเองไม่ติดของ spinach พบว่าเกิดจากการไม่มีการปฏิสนธิเนื่องจากหลอดเรณูเจริญแตกเป็นกิ่งก้าน (Ramana, 1975) เช่นเดียวกับการผสมตัวเองของมะม่วงเขียวเสวย พบว่าหลอดเรณูมักแตกเมื่อเจริญถึงก้านของเกสรเพศเมียทำให้ไม่เกิดการปฏิสนธิขึ้น (ศักดิ์, 2536) ใน almond (*Prunus dulcis* (Mill) D.A. Webb syn.) (*P. amygdalus* Batsch.) ที่ผสมตัวเองและผสมข้ามแล้วพบว่า หลอดเรณูสามารถเจริญลงไปในก้านเกสรเพศเมียได้ 2 แบบ โดยการผสมตัวเองพบ การเจริญของหลอดเรณูเกิดขึ้นได้ช้ามากหลังเข้าไปใน ovarian locule เข้าอวูล (Pimienta et al., 1983) ในสัมพบว่า การเจริญของหลอดเรณูในเพศเมียสัมพันธ์กับอูณหภูมิจาก (Williams et al., 1984) การงอกของหลอดเรณูและการเจริญผ่านเกสรเพศเมียของ *Fagopyrum* แบบ interspecific cross เหมือนกับ intraspecific cross แต่มีหลอดเรณูเจริญใน interspecific cross น้อยกว่า (Minami et al., 1992) ในผักกาดหัวมีการศึกษาการถ่าย

เรณูที่เกิดแบบผสมข้ามพบว่า หลอดเรณูจะผ่านเข้าไปในก้านชูเกสรตัวเมียหลังจากการผสม 2-4 ชั่วโมง และเกิดปฏิสนธิระหว่าง 20-24 ชั่วโมง (กัญญ์ชลิ, 2532)

## 6. การขยายพันธุ์

ต้นสบู่ดำเป็นพืชที่ทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแห้งแล้งได้ดี แม้มีปริมาณน้ำฝนต่ำเพียง 300-1,000 มิลลิเมตร ต่อปี ทำให้เจริญได้ดีในแถบเขตร้อน หรือในพื้นที่ที่มีความสูงจนถึง 1,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล หรือพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ (Joker and Jepsen, 2003) จึงทำให้ต้นสบู่ดำสามารถเจริญได้อย่างแพร่หลายแม้ในพื้นที่ที่มีสภาพไม่เหมาะสม ต้นสบู่ดำสามารถให้ผลผลิตได้ตลอดปีประมาณ 2-4 กิโลกรัม/ต้น/ปี อย่างไรก็ตาม ต้นสบู่ดำอาจให้ผลผลิตสูงกว่านี้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุ สภาพแวดล้อม การจัดการ และวิธีการปลูก โดยสามารถให้ผลผลิตได้ตั้งแต่ปีแรก และให้ผลผลิตสูงสุดเมื่ออายุประมาณ 3-5 ปี (Becker and Francis, 2000) ทั้งนี้สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยมีลักษณะของผล 3 ลักษณะ คือ พันธุ์ที่มีผลกลมขนาดปานกลาง ผลกลมรีขนาดเล็ก และผลกลมขนาดปานกลางและเปลือกหนา (จร, 2527) การปรับปรุงพันธุ์อาจทำได้โดยใช้วิธีฉายรังสีแกมมาให้กับเมล็ดสบู่ดำ ซึ่งทำให้ต้นสบู่ดำมีลักษณะต้นเตี้ย ระยะเวลาออกดอกเร็วขึ้น และปริมาณผลผลิตต่อต้นสูง แต่มีขนาดของเมล็ดเล็กกว่าการไม่ฉายรังสี (วิมลรัตน์ และคณะ, 2533) สำหรับวิธีขยายพันธุ์ (สมบัติ, 2548) อาจทำได้หลายวิธี ดังนี้

การเพาะเมล็ด วิธีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดสามารถทำได้โดย เลือกเมล็ดจากฝักที่มีสีเหลืองแก่แก่เมล็ดน้ำตาล ซึ่งเป็นระยะแก่เต็มที่ ไม่มีระยะพักตัว จึงงอกได้ทันทีภายใน 10 วัน หลังจากเพาะในดิน ทั้งนี้ เมล็ดสบู่ดำที่แก่เต็มที่หรืออยู่ในสภาพเมล็ดแห้งจะพ้นจากระยะพักตัวในช่วงผลสุกจึงสามารถนำไปปลูกได้ทันที ซึ่งควรปลูกในช่วงฤดูฝน ประมาณต้นเดือนพฤษภาคม ถึงกันยายน ซึ่งเป็นช่วงที่ดินมีความชื้นเหมาะแก่การงอกของเมล็ด (ชำนาญ และคณะ, 2549) การงอกจะมีส่วนของใบเลี้ยงคู่ 2 ใบโผล่พ้นดิน โดยการยึดตัวของส่วนได้ข้อใบเลี้ยง หลังจากนั้น ต้นกล้าจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งควรอนุบาลต้นกล้าให้มีอายุประมาณ 2-3 เดือน หรือมีความสูงประมาณ 30-40 เซนติเมตร ก่อนนำไปปลูกในแปลง เพราะจะช่วยให้ต้นกล้าสามารถปรับตัวกับสภาพแปลงได้ดีและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเริ่มให้ผลผลิตประมาณ 8-10 เดือน หลังปลูก สำหรับถั่วพาะหรือกระบะทรายใช้อัตราส่วน ดิน:ทราย:แกลบ:ปุ๋ยคอก เท่ากับ 3:3:3:1

การปักชำ ควรใช้ท่อนพันธุ์ที่มีสีเขียวปนน้ำตาลเล็กน้อย ซึ่งเป็นกิ่งที่ไม่อ่อนและแก่เกินไป ทำให้สามารถแตกรากได้ง่าย สำหรับความยาวกิ่งปักชำที่เหมาะสม คือ ประมาณ 30 เซนติเมตร โดย

ปักลงในถุงเพาะหรือกระบะทรายอัตราส่วนเช่นเดียวกับดินผสมเพาะเมล็ด และใช้เวลาปักชำประมาณ 2 เดือน จึงสามารถนำไปปลูกและให้ผลผลิตหลังปลูกประมาณ 6–8 เดือน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถเลือกใช้จากส่วนของยอดอ่อน ใบ และก้านใบของต้นสบู่ดำ ปลูกเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์และชักนำได้ต้นอ่อนจำนวนหลายๆ ต้น จึงทำให้สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมาก

## 7. การสกัดน้ำมัน

ในเมล็ดสบู่ดำที่เก็บผลผลิตมาประมาณ 4 กิโลกรัม จะสกัดน้ำมันได้ 1 ลิตร หรือประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิต การสกัดน้ำมันอาจทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีจะให้ปริมาณน้ำมันแตกต่างกัน เช่น ในห้องปฏิบัติการ ใช้วิธีบดให้ละเอียดแล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย ปิโตรเลียมอีเทอร์ จะได้น้ำมัน 34.96 เปอร์เซ็นต์ จากเมล็ดรวมเปลือก และ 54.68 เปอร์เซ็นต์ จากเนื้อเมล็ด เช่นเดียวกับการสกัดด้วยระบบไฮดรอลิกและระบบอัดเกลียว จะได้น้ำมันใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำมันตกค้างในกาก 10-15 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดต้องใช้ผลสบู่ดำแห้ง (ผลสีเหลืองถึงสีดำ) ที่แก่จากต้น นำมาแกะเพาะเปลือกออกให้เหลือเฉพาะเมล็ด นำไปล้างน้ำทำความสะอาดและสิ่งลมหให้เมล็ดแห้ง ก่อนการสกัดน้ำมันด้วยระบบไฮดรอลิกและระบบอัดเกลียว จะต้องนำเมล็ดมาทุบให้แตกหรือบดหยาบ แล้วนำไปเพิ่มความร้อน โดยการนำไปตากแดด หรือนึ่ง หรือนำเข้าตู้อบก่อนนำเข้าเครื่องสกัด เพื่อให้การสกัดน้ำมันกระทำได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้ น้ำมันที่ได้จากการสกัดจะต้องกรองสิ่งสกปรกออก หรือทิ้งให้ตกตะกอนก่อนนำไปใช้งาน และสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ต้องใช้น้ำมันชนิดอื่นผสมอีก ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษของน้ำมันสบู่ดำ ทำให้เกษตรกรใช้งานได้สะดวกและไม่มีความยุ่งยาก (สมบัติ, 2548)

## 8. เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์พัฒนาขึ้นโดย Gary Mullis ในปี ค.ศ. 1983 เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลาย ร่วมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์ หรือนำไปโคลน การทำพีซีอาร์ เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลายๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีเบสคู่สม

กับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอแต่ละสาย และมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์ คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมด หรือ ทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับ ชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์มีความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำคือสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อน แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วน ปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย เข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใส่ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้น จนถึง  $2^n$  เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป  $n$  รอบ (สุรินทร์, 2552)

## 9. เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมาย (marker) ใช้เพื่อบ่งชี้ความแตกต่าง หลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณ และคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างระหว่าง และภายในสปีชีส์ ประชากร หรือ แต่ละตัวอย่าง (สุรินทร์, 2552; Kumar, 1999) มี 2 ประเภท ได้แก่

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นเครื่องหมายที่จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยใช้วิธีเปรียบเทียบจากลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะใบ ลำต้น และจำนวนเกสรเพศผู้ เป็นต้น ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้ อาจขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้ตรวจสอบผิดพลาด บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ แต่อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยายังคงมีความสำคัญเนื่องจากมีราคาถูก และใช้พิจารณาประกอบเครื่องหมายโมเลกุลอื่นได้

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular markers) เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน โมเลกุลของดีเอ็นเอ

เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน โดยแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส และย้อมดูแถบโปรตีนด้วยสารที่จำเพาะ ข้อดีของเครื่องหมายโปรตีน คือ ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก และแถบของโปรตีนที่ปรากฏแสดงการข่มร่วมกัน (codominance) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบฮอโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ แต่ก็มีข้อจำกัด คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากนัก และการแสดงออกของยีนที่ศึกษาขึ้นอยู่กับ ชนิดเนื้อเยื่อ ระยะเวลา ระยะการเจริญเติบโต และอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ โปรตีนยังสูญเสียสภาพได้ง่าย ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้นาน จึงต้องวิเคราะห์ผลในระยะเวลาจำกัด อีกทั้งการตรวจสอบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีระดับต่ำเมื่อเทียบกับระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน และการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง อาจไม่มีผลต่อระยะการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีข้อดีว่าการตรวจสอบด้วยโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอ มีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นานกว่าเครื่องหมายโปรตีน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ ตรวจสอบได้ในเนื้อเยื่อใดๆ ที่มีการเจริญเติบโต ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบได้ทั้งในส่วนที่เป็นยีน และไม่ยีน หรือ ส่วนที่มีการแสดงออก หรือไม่ก็ได้ และครอบคลุมทั้งจีโนม มีวิธีการตรวจสอบมากมาย

## 10. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง และในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม หรือ ดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้ เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ เกิดภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ วิธีตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของดีเอ็นเอทำได้โดยหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) (สุรินทร์, 2552) หรือ ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงออกในรูปของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อาจทำได้โดยใช้วิธีไฮบริไดเซชัน (Hybridization-based DNA markers) เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (Tanksley *et al.*, 1989) หรือ วิธีเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR-based DNA markers) เช่น RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) (William *et al.*, 1990) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้น ๆ และ AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) มีการพัฒนาขึ้น โดย Zabeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตร ในปี ค.ศ. 1993 เป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณโดยอาศัยหลักการพีซีอาร์ เป็นต้น (Vos *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอตามลักษณะการข่ม เช่น เครื่องหมายที่มีการข่มสมบูรณ์ แสดงลักษณะมี และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต ที่เป็นฮอโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ ได้แก่ RAPD และ AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษา โดยไม่มีความจำเป็นต้องรู้ข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาก่อน และศึกษาได้ครั้งละหลายตำแหน่ง (multilocus detection) ส่วนเครื่องหมายที่มีการข่มร่วม เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงการข่มร่วมกัน จึงสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เป็นฮอโมไซโกต และ เฮเทอโรไซโกตได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ ได้แก่ RFLP, SSR (Simple Sequence Repeat) หรือ microsatellites และ SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) ซึ่งจำเป็นต้องมีข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ให้จำเพาะกับตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในจีโนม (singlelocus detection) เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และ สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช และ สัตว์อย่างกว้างขวาง

## 11. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints)

เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ สามารถตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึมได้จากการนำดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (genomic DNA) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วย้ายดีเอ็นเอจากบนแผ่นเจล ไปบนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) ไฮบริไดซ์กับ โพรบ (probe) ซึ่ง โพรบนี้มาจากดีเอ็นเอส่วนที่จำเพาะกับ ยีนหรือที่เป็นมินิแซทเทลไลท์ (minisatellite) สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน (multi-locus) แล้วเกิดเป็นลายพิมพ์ที่มีความจำเพาะ (Jeffrey *et al.*, 1985) มีความหมายเดียวกับ DNA profiling หรือ DNA typing ในปัจจุบันยังหมายถึง วิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบหลายตำแหน่งพร้อมกัน (multi-locus PCR)

เพราะทำให้ได้แบบแผนดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน สำหรับ การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมนุษย์ในทาง การแพทย์ จะใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ที่เป็นแบบเฉพาะครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single locus PCR) แต่ทำหลายตำแหน่งโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่มาวิเคราะห์ร่วมกัน ก็สามารถนำมา วิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละบุคคลได้ (สุรินทร์, 2552)

## 12. Single strand conformational polymorphism (SSCP)

เอสเอสซีพีเป็น วิธีตรวจหาพอลิมอร์ฟิซึมจากดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR ซึ่ง สามารถตรวจสอบความแตกต่างระดับ 1 นิวคลีโอไทด์ หรือ point mutation ได้ ในกรณีที่เบสที่ แตกต่างกันเป็นส่วนหนึ่งของเบสในบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ สามารถบอกความแตกต่าง โดย ใช้เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอ แต่ถ้าเป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสในบริเวณที่ไม่มีผลต่อการตัดของเอนไซม์ หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ไม่ทราบแน่ชัด สามารถตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึมได้ โดยใช้ เทคนิค SSCP โดยอาศัยหลักที่ว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ (native condition) จะมีการขด หรือพันกันภายในโมเลกุลเกิดเป็น โครงสร้างจำเพาะขึ้นกับองค์ประกอบของเบสของดีเอ็นเอสาย นั้น หรือมีโครงรูป (conformation) ที่จำเพาะ ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการ ทำอิเล็กโทร โฟริซิสใน non-denaturing polyacrylamide gel โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีเบสแตกต่างกันแม้เพียงเบส เดียวก็สามารถทำให้เกิด โครงรูปแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในระหว่างการ ทำอิเล็กโทร โฟริซิสเร็วช้าต่างกัน ความไวของการตรวจ SSCP ขึ้นกับความยาวของสายดีเอ็นเอที่ต้องการ ตรวจสอบ เนื่องจากการตรวจหาความแตกต่างของ ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกันเพียง 1 เบส ถ้า ความยาวของสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบเป็นสายดีเอ็นเอที่มีความยาวมาก โอกาสตรวจพบ ความแตกต่างโดยเทคนิค SSCP มีน้อย ยิ่งสายดีเอ็นเอมีความยาวมากขึ้นเท่าใด ความไวในการตรวจ พบความแตกต่างโดยเทคนิค SSCP ก็ยิ่งน้อยลงเท่านั้นขนาดความยาวของสายดีเอ็นเอที่จะตรวจหา พอลิมอร์ฟิซึม คือ ไม่ควรเกิน 200 นิวคลีโอไทด์ ถ้าสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมีขนาดใหญ่ อาจ ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อน เพื่อให้ได้ ขนาดความยาวของสายดีเอ็นเอที่เหมาะสม เรียกว่า restriction endonuclease fingerprinting SSCP (Ref-SSCP) (สุรินทร์, 2552) เทคนิค SSCP ได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็น เอมนุษย์เป็นครั้งแรก (Orita *et al.*, 1989) อีกทั้งยังนำไปใช้ตรวจสอบความหลากหลายทาง พันธุกรรมของ *Aegilops mutica* (Ohsako *et al.*, 1996) และบัวหลวง (กนกวรรณ, 2551) รวมทั้ง ประยุกต์ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Cronartium ribicola* ซึ่งก่อโรค white pine blister rust ในพืชตระกูลสน (Joly *et al.*, 2006 )

### 13. Sequence characterized amplified region (SCAR)

SCAR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ที่พัฒนามาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดย PCR แบบสุ่มหลายตำแหน่ง เช่น RAPD หรือ AFLP โดยการทำให้ RAPD มีข้อด้อยในเรื่องความคงตัวของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ส่วน AFLP มีข้อด้อยที่มีหลายขั้นตอน วิธีการทำซับซ้อน ดังนั้นถ้าตรวจสอบดีเอ็นเอตัวอย่างแล้วพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ได้ จึงนิยมเปลี่ยนแถบดีเอ็นเอ หรือเครื่องหมายนั้นให้สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบจำเพาะ โดยการตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าว แยกนำมา โคลนแล้วหาลำดับเบส จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่จากลำดับเบสที่ได้ โดยตัดส่วนปลายที่เป็นส่วนของไพรเมอร์จากเครื่องหมายเดิมออกก่อน จะได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงตำแหน่งเดียว นำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ใหม่มาใช้ตรวจสอบโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเดิม จะพบความแตกต่างในลักษณะ การเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอแบบเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอเดิม แต่เป็นการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR แบบจำเพาะเพียง 1 ตำแหน่ง ซึ่งมีความแม่นยำและทำได้รวดเร็วกว่า ได้มีการนำไปใช้การระบุพันธุ์ลำไย ปทุมมา กวางเครือ และมะเดื่อ (สุปราณี, 2549) ระบุชนิดของพืชสกุลหม้อข้าวหม้อแกงลิง (อารีย์, 2552) อีกทั้งยังนำไปใช้ในการคัดเลือกยุคาลิปตัสลูกผสม (เรวดี และคณะ, 2549) บางครั้งอาจพบว่าเครื่องหมาย SCAR ที่ออกแบบไพรเมอร์ใหม่อาจไม่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง คือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างก็ได้ เนื่องจากความแตกต่างอาจอยู่ที่ตำแหน่งที่ไพรเมอร์ของเครื่องหมายเดิมจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (priming site) ในบางตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งนี้จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้นได้ เมื่อออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่จากลำดับเบสที่อยู่ถัดมา จึงไม่พบความแตกต่างระหว่างแต่ละตัวอย่าง จึงไม่สามารถใช้เครื่องหมาย SCAR นั้นได้ (สุรินทร์, 2552)

### 14. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เอเอฟแอลพี เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐาน คือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี และประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกัน การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มากจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้นๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์

ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ต่อไป ด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก็จะสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในคราวเดียวกันมีมากและไม่สามารถจะแยกจากกันหรือตรวจสอบโดยวิธีต่างๆ ไป การสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำเอเอฟแอลพีจึงเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณตัดจำเพาะ สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้นเท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วนและสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไป แบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่ง เรียกว่า ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพีจึงเป็นวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอวิธีหนึ่ง แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล เรียกว่า เครื่องหมาย เอเอฟแอลพี (AFLP marker) ใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใดๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ แม้ว่าวิธีการทำเอเอฟแอลพีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกกลุ่มสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเดียวกัน แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากมีชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้นคือการมีแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำเอเอฟแอลพีจึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะเด่น (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพี แบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า (สุรินทร์, 2552) การใช้ประโยชน์จากเทคนิคเอเอฟแอลพี มีการนำเทคนิคเอเอฟแอลพีมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเทคนิคเอเอฟแอลพีมีข้อได้เปรียบกว่าเทคนิคอื่นๆ คือ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับเทคนิคอาร์เอพีดี จึงทำได้อย่างกว้างขวาง ทำให้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย ทำให้เกิด polymorphism ได้จำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี เช่นวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกสายพันธุ์อย่างพาราพันธุ์ปลูก (สุนิดา, 2549) ใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต บ่งชี้ลักษณะเพศและความหลากหลายทางชีวภาพของปรองสกุล *Cycas* และ *Zamia* (สจี, 2547) การจดทะเบียนลิขสิทธิ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม

## 15. การสังเคราะห์กรดไขมัน และยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมัน

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันของพืชเป็นวิถีเมแทบอลิซึมปฐมภูมิ (primary metabolic pathway) ที่เกิดขึ้นในพลาสติดของเซลล์พืชทุกเซลล์ (Ohlrogge and Browse, 1995; Ohlrogge *et al.*, 1979; Schmid and Ohlrogge, 1996) ประกอบด้วย 2 กระบวนการ

1. prokaryotic pathway เกิดขึ้นภายในผนังด้านในของคลอโรพลาสต์ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 16:0-ACP (Acyl carrier protein) และ 18:1-ACP

2. eukaryotic pathway เกิดขึ้นที่ ER (endoplasmic reticulum) โดยมีการนำกรดไขมันออกจากคลอโรพลาสต์ ไปสร้างเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวอื่น ๆ และรวมกับ acylglycerol-3-phosphate เพื่อสร้างเป็นไขมันที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ของพืช เช่น ผนังเซลล์ หรือเป็นไขมันสะสมไว้ที่เมล็ด เป็นต้น ไขมันที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์จะอยู่ในรูป DAG (diacylglycerol) เป็น lipid bilayer ทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์ ป้องกันอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์ และยังมีบทบาทใน signal transduction pathway ส่วนไขมันที่เก็บสะสมในเมล็ดนั้นจะอยู่ในรูปของ TAG (triacylglycerol) สะสมในรูปแบบของ oil body มีส่วนของโปรตีนที่เป็นผนังชั้นเดียวห่อหุ้มเรียกว่า oleosin ทำหน้าที่เป็นไขมันสะสมเก็บไว้ให้พลังงานในการงอกของเมล็ดและการถ่ายเอกสาร

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมัน เกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์โดยเริ่มต้นจาก acetyl-CoA ถูกนำเข้ามาในคลอโรพลาสต์แล้วสร้าง malonyl-CoA จาก acetyl-CoA ในพลาสติดโดยปฏิกิริยา carboxylation ที่เร่งโดยเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (ACCase) เปลี่ยน malonyl-CoA เป็น malonyl-ACP โดยเอนไซม์ malonyl CoA: ACP trans acylase แล้วเกิดเป็นปฏิกิริยารวม

(condensation) acetyl-CoA และ malonyl-ACP ได้เป็น acetoacetyl-ACP (3-ketobutyryl-ACP) โดยเอนไซม์ KASIII (ketoacyl-ACP synthase III) ปฏิกิริยานี้เป็นการรวมสาร C-2 และสาร C-3 ได้สาร acetoacetyl-ACP (C-4) และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออก ( $\text{CO}_2$ ) 1 โมเลกุล ต่อมาเกิดการ reduced กลุ่ม Keto ( $-\text{C}=\text{O}$ ) ในตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ของ 3-ketobutyryl-ACP ให้เป็นกลุ่มของ hydroxyl ( $-\text{OH}$ ) ได้เป็น 3-hydroxybutyryl-ACP ด้วยเอนไซม์ ketoacyl-ACP reductase โดยใช้ NADPH เป็น coenzyme เรียก ปฏิกิริยา reduction จากนั้นเกิดปฏิกิริยา dehydration ที่มีการดึงหมู่  $-\text{OH}$  ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ของ 3-hydroxybutyryl-ACP ออก ทำให้เกิดพันธะคู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 2 ได้เป็น Trans- $\Delta^2$ -butenoyl-ACP ด้วยเอนไซม์ 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase แล้ว reduction พันธะคู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 2 ให้เป็นพันธะเดี่ยวด้วยเอนไซม์ enoyl-ACP reductase โดยใช้ NADPH เป็น coenzyme ได้เป็น Butyryl-ACP ซึ่ง เป็นรอบแรกในการสังเคราะห์กรดไขมัน ในรอบที่สองของการสังเคราะห์กรดไขมัน butyryl-ACP จะถูกเติมคาร์บอนเพิ่มอีก 2 อะตอมในปฏิกิริยา condensation โดยนำคาร์บอนมาจาก malonyl-ACP การต่อสายยาวของคาร์บอนในรอบต่อไปโดยปฏิกิริยา condensation ด้วยเอนไซม์ KAS (ketoacyl-ACP synthase) จะใช้เอนไซม์ต่างชนิดจากรอบแรก เนื่องจาก KAS มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีความยาวของสายคาร์บอนต่างกัน ดังนั้น KASIII จำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีความยาวคาร์บอน 2 อะตอม KASI จำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีความยาวของสายคาร์บอน 4-14 อะตอม และ KASII จำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีคาร์บอน 16 อะตอม

ในการสร้างกรดไขมันชนิดต่างๆ มีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (amino acid) และความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสามารถจำแนกเอนไซม์ FAT ในพืชได้เป็น 2 ชนิด คือ FATA และ FATB ซึ่งมีวิวัฒนาการแยกออกจากกัน FATA ที่รู้จักกันดี ได้แก่ Oleoyl-ACP thioesterase และเนื่องจากกรดไขมันที่พบมากในพืชคือ Oleic acid เอนไซม์ FATA จึงจัดอยู่ในกลุ่ม house keeping enzyme สำหรับ FATB จะค่อนข้างจำเพาะกับ saturated acyl-ACP (Hawkins and Kridl, 1998; Kridl *et al.*, 1992) พบว่าปลายทางด้าน N-terminal ของเอนไซม์ FATA และ FATB เป็นตัวบ่งชี้ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (Salas and Ohlogge, 2002) เอนไซม์ ER linoleate desaturase หรือ FAD3 เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์  $\omega$ -3 fatty acid desaturase มีตำแหน่งอยู่ที่เมมเบรน (membrane bound enzyme) โปรตีน FAD3 พบอยู่ที่ ER ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน Linoleic acid (18:2) เป็น Linolenic acid (18:3) ที่ตำแหน่ง  $\omega$ -3 ส่วน ER linoleate desaturase (FAD6) พบในคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน Oleic acid (18:1) เป็น Linoleic acid (18:2) ที่ตำแหน่ง  $\omega$ -6 (Mazliak, 1994)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. พืชที่นำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

พืชในสกุล *Jatropha* ที่ใช้ผสมพันธุ์ ประกอบด้วย สบู่ดำทั้งในและต่างประเทศ สบู่ดำพันธุ์ดีจากโครงการ KU Biodiesel (KUBP) สบู่แดง หนุมานนั่งแท่น ผีนต๋น และเข็มปัดตาเวีย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รายชื่อพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ผสมพันธุ์ จำนวน 43 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	หมายเลข	รายชื่อ
1	2	สบู่แดง 1
2	3	หนุมานนั่งแท่น 1
3	4	สบู่ดำ สหรัฐ 8.45 kr
4	6	สบู่ดำ สุขสันต์ หัวหิน (ไม่มีพีย)
5	7	เข็มปัดตาเวียดอกสีแดง
6	8	สบู่ดำ จีน
7	9	สบู่ดำ KUBP 80-3 (อ. เมือง จ. พัทลุง)
8	10	เข็มปัดตาเวียดอกแดงใบแฉก
9	11	สบู่ดำ มุกดาหาร 10kr
10	12	สบู่ดำ ดินเค็ม (ต. หนองสรวง อ. ขามทะเลสอ จ. นครราชสีมา)
11	13	สบู่ดำ KUBP 16 (อ. ยางกราด จ. กาฬสินธุ์)
12	14	สบู่ดำ สุขสันต์ 1 (ไม่มีพีย)
13	15	สบู่ดำ KUBP 78-9
14	16	เข็มปัดตาเวียดอกสีชมพู 1
15	17	สบู่ดำ FF25
16	18	สบู่แดง 2
17	19	สบู่ดำ EL23
18	20	สบู่ดำ ศรีลังกา

## ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	หมายเลข	รายชื่อ
19	21	สบู่ดำ D1 อินเดีย
20	22	สบู่ดำ KUBP 78-9
21	23	สบู่ดำ Suriname
22	24	สบู่ดำ อินเดีย Chennai
23	25	สบู่ดำ รังสฤษฎ์ 3/4
24	26	สบู่ดำ ลาว
25	33	ฝิ่นต้น 1
26	34	สบู่ดำ อินเดีย สุขสันต์
27	35	สบู่ดำ รังสฤษฎ์ 10/1
28	36	สบู่ดำ 72
29	37	หนุมนั่งแทน 2 (ใบ & ดอก)
30	38	สบู่ดำ สุขสันต์ #6
31	39	หนุมนั่งแทน 3
32	40	สบู่ดำ รังสฤษฎ์ 10/3
33	41	สบู่ดำ อินเดีย 39
34	42	สบู่ดำ วิชาญ เมล็ด 1 (ไม่มีพิษ)
35	43	สบู่แดง 3
36	44	หนุมนั่งแทน 4
37	45	สบู่ดำ JD
38	46	เข็มปัตตาเวียดอกสีชมพู 2 (ดอก)
39	47	สบู่แดง 4 (ดอก)
40	50	สบู่ดำมาดากาสก้า (เปลือกบาง)
41	51	เข็มปัตตาเวียดอกแดง ใต้หวัน
42	53	สบู่ดำผลแดง
43	54	สบู่ดำพระยาพิชัยต้นเดียว

## 2. อุปกรณ์ที่ใช้ทดลอง

- 2.1 อุปกรณ์การผสมพันธุ์สบู่ดำ เช่น ปากคีบ กรรไกร ถุงตาข่าย ป้ายชื่อ
- 2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกสบู่ดำ เช่น กระถาง ดิน ปุ๋ย
- 2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
  - 2.3.1 โกร่งบดตัวอย่าง
  - 2.3.2 เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง และบีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ เป็นต้น
  - 2.3.3 เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น KS 125B บริษัท IKA Labortechnik Stufen, Germany
  - 2.3.4 เครื่องคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมต่อกับ internet
  - 2.3.5 เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) และภาพถ่าย (gel documentation) รุ่น DOC-PRINT-1000/26M บริษัท Vilber Lourmat, France
  - 2.3.6 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น AR 2130 บริษัท AdventurerTM, USA
  - 2.3.7 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น PTC-100TM บริษัท MJ Research, USA
  - 2.3.8 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (refrigerated centrifuge) รุ่น 3K20 บริษัท Sigma, Germany, เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge) รุ่น 1010 บริษัท Century Scientific, England
  - 2.3.9 เครื่อง spectrophotometer รุ่น Lamda UV/VIS spectrophotometer บริษัท Perkin Elmer, USA
  - 2.3.10 ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis
  - 2.3.11 ชุดเครื่องมือ acrylamide gel electrophoresis รุ่น Protein®II xi cell บริษัท Biorad, USA
  - 2.3.12 ตู้เย็น รุ่น TH-890 บริษัท Sharp ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส บริษัท Mirage และ ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส รุ่น 8558 S/N 86939-206 Bio-freezer® บริษัท Forma Scientific, USA
  - 2.3.13 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิได้ (oven) บริษัท Gallenkamp, Japan
  - 2.3.14 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตร ได้ บริษัท Gilson, France พร้อม tip ขนาด 10,200 และ 1,000 ไมโครลิตร
  - 2.3.15 หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko, Japan
  - 2.3.16 หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml) และหลอดใส่สารขนาด 15 ml
  - 2.3.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert, Germany
  - 2.3.18 หลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR tube)

2.3.19 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กระดาษขึงสาร ข้อนตักสาร ปากคีบ ถุงมือ ถุงพลาสติกใส แผ่นพลาสติกใส แผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ ถาดพลาสติก และแผ่น cellophane เป็นต้น

### 3. สารเคมีและเอนไซม์

#### 3.1 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

##### 3.1.1 ไนโตรเจนเหลว

3.1.2 3X CTAB buffer (3 เปอร์เซ็นต์ CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1% polyvinylpyrrolidone: PVP)

##### 3.1.3 beta-mercaptoethanol

##### 3.1.4 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ใน 0.7 M NaCl

##### 3.1.5 คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) โดยปริมาตร

##### 3.1.6 เอทานอล 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ และ เอทานอลสัมบูรณ์

##### 3.1.7 10 mg/ml RNase A บริษัท US Biological, USA

##### 3.1.8 TE buffer (10:0.1 = 10 mM Tris pH 8.0 : 0.1 mM EDTA)

#### 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ agarose gel electrophoresis

##### 3.2.1 เจลอะกาโรส (Research Organic)

##### 3.2.2 loading dye (0.15 เปอร์เซ็นต์ bromphenol blue ใน 50 เปอร์เซ็นต์ glycerol)

3.2.3 1X TBE buffer (tris base 10.8 กรัม, boric acid 5.5 กรัม และ 500 mM EDTA pH 8.0 4 มิลลิลิตร)

##### 3.2.4 0.5 mg/ml เอซีเดียม โบรไมด์ (Bio Basic)

##### 3.2.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder mix) บริษัท GeneRuler™, USA

#### 3.3 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

##### 3.3.1 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 500 mM KCl)

##### 3.3.2 50 mM MgCl<sub>2</sub>

##### 3.3.3 2 mM dNTP บริษัท Fermentas, USA

##### 3.3.4 เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase บริษัท Invitrogen Life Technology, Brazil

##### 3.3.5 5 pmol primer

##### 3.3.6 ultra pure water

### 3.4 สารเคมีสำหรับ denaturing และ non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

- 3.4.1 acrylamide บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden
- 3.4.2 methylene bisacrylamide บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden
- 3.4.3 10% ammonium persulphate (APS)
- 3.4.4 TEMED (N', N', N', N',-tetramethyl ethylenediamine)
- 3.4.5 1X TBE buffer
- 3.4.6 urea (USB)
- 3.4.7 bind silane (Plusone)
- 3.4.8 repel silane (Plusone)
- 3.4.9 ซิลเวอร์ไนเตรด
- 3.4.10 1 N และ 10 N NaOH
- 3.4.11 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์
- 3.4.12 formamide
- 3.4.13 formaldehyde
- 3.4.14 bromophenol blue
- 3.4.15 xylene cyanol
- 3.4.16 glacial acetic acid
- 3.4.17 restriction enzyme บริษัท Fermentas, USA

### 3.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการเจริญของหลอดเรณูและควมมีชีวิตของเรณู

- 3.5.1 50 เปอร์เซ็นต์ FAA (Formalin-Acetic-Alcohol 18:1:1, 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol/glacial acetic acid/formaldehyde)
- 3.5.2 1 N NaOH
- 3.5.3 aniline blue 0.1 เปอร์เซ็นต์
- 3.5.4 acetocamine 1 เปอร์เซ็นต์

## 4. โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

โปรแกรม NTSYSpc-2.20k ใช้ในการสร้าง phylogenetic tree จากข้อมูลการใส่เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี

## วิธีการ

### 1. การผสมพันธุ์พืช

1.1 ปลูกสับดูคำพันธุ์ต่างๆและพืชในสกุล *Jatropha* ตาม ตารางที่ 1

1.2 ผสมพันธุ์สับดูคำกับสับดูคำแดง สับดูคำกับฝิ่นต้น สับดูคำกับหนุมนานั่งแทน และสับดูคำกับเข็ม  
ปัตตาเวียดอกสีแดงและ ดอกสีชมพู ทั้งสายตรง และ สลับพ่อแม่ โดยมีขั้นตอนการผสม  
พันธุ์ ดังนี้

1.2.1 emasculation ตัดดอกเพศผู้ทั้งหมดออกจากช่อดอกของต้นแม่ ทำในช่วงดอกตูม  
คงเหลือไว้แต่ดอกเพศเมีย โดยอาศัยประสบการณ์จากตำแหน่งดอกเพศเมีย โดย emasculation ก่อน  
ดอกบาน 1-2 วัน คลุมดอกเพศเมียด้วยถุงผ้าตาข่าย ป้องกันแมลงมาช่วยผสมพันธุ์

1.2.2 เก็บเรณู (pollen grains) เมื่ออับเรณู (anther) บานเต็มที่ จากต้นพ่อที่ต้องการนำมา  
ผสมพันธุ์ ใช้พู่กันแตะเรณูไปป้ายที่ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) ของดอกเพศเมียที่เตรียมไว้ การถ่าย  
เรณูทำในช่วงเช้าเวลาประมาณ 8-10 น. ที่มีแสงแดดจ้า สังเกต stigma มีความพร้อมที่จะรับเรณู  
(receptive)

1.2.3 ห่อหุ้มดอกที่ได้รับการถ่ายเรณูแล้ว ด้วยถุงผ้าตาข่าย เพื่อป้องกันแมลง รอนจนติด  
เมล็ด เมื่อเมล็ดลูกผสมแก่เก็บเมล็ดมาปลูก เมื่อลูกผสมเจริญจนมีใบงอกออกมา เก็บใบมาเพื่อ  
ตรวจสอบความเป็นลูกผสมในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลต่อไป

1.2.4 เมื่อได้ลูกผสมที่ทำการตรวจสอบโดยเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อยืนยันความเป็นลูก  
ผสมแล้ว ก็จะนำไปทำการผสมกลับไปยังสับดูคำ

### 2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบสับดูคำ สับดูคำแดง ฝิ่นต้น หนุมนานั่งแทน เข็มปัตตาเวีย ลูกผสม $F_1$ และ ลูกผสมกลับ โดยวิธีประยุกต์จาก Doyle and Doyle (1987)

เตรียมสารละลาย 3X CTAB [2% hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB: Sigma  
H-5882), 1.4 M NaCl, , 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0] ใส่หลอดขนาด 15 ml ปริมาตร  
5 ml เติม  $\beta$ -mercaptoethanol 5  $\mu$ l จากนั้นบดตัวอย่างใน โกร่งคั่วใน โตรเจนเหลว จนตัวอย่างมี  
ลักษณะเหมือนผงแป้ง ตักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่หลอดเขย่าให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว บ่มที่ 65  
องศาเซลเซียส นาน 45 นาที เติมน้ำละลาย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) หลอดละ 5 ml นาที  
กลับหลอดไปมาเบาๆให้เข้ากัน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้น

ดูดสารละลายตอนบนใส่หลอด 15 ml หลอดใหม่หลอดละ 5 ml เติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ปริมาตร 500  $\mu$ l เติมสารละลาย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) หลอดละ 5 ml กลับหลอดไปมาเบาๆ ให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที จะได้สารละลายสองส่วนแยกกัน ดูดสารละลายใสตอนบนหลอดละ 300  $\mu$ l ใส่หลอดใหม่แล้วเติม absolute alcohol 300  $\mu$ l เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ กลับหลอดไปมาเบาๆ ถ้าตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาก เกี่ยวดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้วปลายงอ แต่ถ้าตะกอนดีเอ็นเอที่ได้น้อย ให้ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ ethanol ตามลำดับ ปล่อยให้ตะกอนแห้งและละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10: 0.1) 100  $\mu$ l และเติมเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้นหลอดละ 2  $\mu$ l บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซิสใช้ 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel และ โดยการวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer ถ้าอัตราส่วนของ  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ระหว่าง 1.6 - 1.8 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ หากมีต่ำกว่า 1.6 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน แต่ถ้าค่าสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ วิเคราะห์ ปริมาณดีเอ็นเอจากการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตของกรดนิวคลีอิกในช่วงความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 1 mg / ml จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเท่ากับ 20 หน่วย ( $A_{260}$ ) ดังนั้นสามารถคำนวณปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้จาก

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (mg/ml)} = A_{260} \times 1/20$$

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (ng/\mu l)} = A_{260} \times 1/20 \times 1000 = A_{260} \times 50$$

กรณีใช้สารละลายดีเอ็นเอเจือจาง 100 เท่า (ดีเอ็นเอ 3  $\mu$ l ต่อน้ำกลั่น 297  $\mu$ l) ในการตรวจสอบด้วยเครื่อง spectrophotometer จะสามารถคำนวณปริมาณกรดนิวคลีอิกในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตรได้โดยคูณด้วย dilution factor ( $A_{260} \times 50 \times 100 \text{ ng/\mu l}$ )

### 3. การตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

#### 3.1. เครื่องหมายจำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในสบู่ดำ

ใช้เครื่องหมายจำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน 2 ยีนที่พัฒนาโดยญาตวี (2552) ได้แก่ *KASII* (3-ketoacyl-ACP synthase II) และ *FATA* (Acyl-ACP thioesterase A) ดังตารางที่ 2 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของตัวอย่างพ่อแม่และลูกผสม โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์

25  $\mu$ l ประกอบด้วย จี โนมิคตีเอ็นเอ (50 ng/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, forward และ reverse primers (5pmol) ชนิดละ 2  $\mu$ l, 10X PCR buffer 2.5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (50 mM) 1  $\mu$ l, dNTP mix (2.5 mM) 1  $\mu$ l *Taq* DNA polymerase (5 u/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l และน้ำกลั่น 14.3  $\mu$ l โพรแกรมการทำพีซีอาร์ ประกอบด้วย 1 รอบ สำหรับการคลายเกลียวและแยกสายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 35 รอบ สำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing temperature (ประมาณ 52-62 องศาเซลเซียส ขึ้นกับชนิดของไพรเมอร์) นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที รอบสุดท้ายเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 62 องศาเซลเซียส ขึ้นกับชนิดของไพรเมอร์) นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที รอบสุดท้ายเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	Ta (°C)	ความยาว (~bp)
<i>KASII</i>	F: GCTTAGCGTTTGAGCCTTG TAG R: CAACACCCATTCCAGTGACAAC	62	800
<i>FATA</i>	F: ACTGCTACCGTTGAGACTATCG R: GAATCCAGTCACGTCTAGTTCC	61	1,100

### 3.2 เครื่องหมายจำเพาะกับพันธุ์พืชสกุล *Jatropha*

ใช้เครื่องหมายจำเพาะกับพันธุ์พืชสกุล *Jatropha* ที่พัฒนาโดย ศิรินันท์ (2554) จากลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค AFLP ที่จำเพาะกับสายพันธุ์พืช โดยในสายพันธุ์อื่นไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เพื่อติดตามแอลลีลของพ่อแม่ในตัวอย่างลูกที่ได้จากการผสมกลับ จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3) เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสบู่ดำ 5 คู่ไพรเมอร์ (JC 63-1, JC 2-1, JC 167, JC 33W2 และ JC 137) จำเพาะกับเข็มปัตตาเวีย 9 คู่ไพรเมอร์ (JI 1.1B3, JI 30-1, JI 62-1, JI 83-1, JI 161, JI 163, JI 254, JI 250 และ JI 252) จำเพาะกับฝิ่นต้น 2 คู่ไพรเมอร์ (JM 4.2 W3, JM 64) จำเพาะกับหนุ่มนั่งแท่น 1 คู่ไพรเมอร์ (JP 102-1) และจำเพาะกับสบู่แดง 1 คู่ไพรเมอร์ (JG 177) องค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วยจี โนมิคตีเอ็นเอ

(50 ng/ $\mu$ l) 1.0  $\mu$ l, forward และ reverse primers (5pmol) ชนิดละ 0.5  $\mu$ l, dNTP (2mM) 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR buffer 1.25  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (50mM) 0.375  $\mu$ l, *Taq* DNA polymerase (5 u/ $\mu$ l) 0.1 $\mu$ l และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 8.275  $\mu$ l โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, 35 รอบของ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 48-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 3 ไพรมเมอร์จำเพาะกับพันธุ์พืชในสกุล *Jatropha* ที่พัฒนาจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค AFLP

ชื่อไพรมเมอร์	ลำดับเบสของไพรมเมอร์ (5'-3')	Ta (°C)	ความยาว (bp)
JC 63-1	F: TTTGCTTTTGTTCGGAGTGTACC R: GTGACCATAAGTGCCATGACAAAA	57	400
JC 2-1	F: AGAGCTATTGAGGGACTTG R: CAAAGTCGGTCTAAAACGGCT	53	400
JC 167	F: TATTGAGGGACTTGAGCTG R: GCTCTATCAAAGTCGGTCTAAA	62	400
JC 33W2	F: TCATTGTCTTTACTGCATGGAGAG R: CACTGATGAGGTAGAAAGTGAGA	53	400
JC 137	F: TCTATCCCTTTACCTTGGG R: GTCATTAGTGCAATGGCT	55	400
JG 177	F: ACCCACTATGACTGATATAG R: CATTGGGAACTTGGCATAT	53	350
J1 1.1B3	F: TGCAGATCGCTATAAAACAGCC R: GGACAAAGGCCTGGTATGAATA	65	500
J1 30-1	F: AGATGTCCTTTTACCGACTTG R: CAAGCCTATCAACTCTCTA	52	700

## ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	Ta (°C)	ความยาว (bp)
JI 62-1	F: AAGGATTGTGGTGGTTTGGG R: CGAGATTTGTAAAGCCAA	56	500
JI 83-1	F: ATCTGGGTAAACCCTTGAGCACAG R: GCTGCCTTTCTCACTTTCGATCCT	56	500
JI 161	F: ATGCACTTCTCTTCTTGGTAC R: CTGGTATCGTGGTGAAAAGAT	60	400
JI 163	F: ACTTGGGTAAACCTTTGAGC R: CAAGATCGAGAGCTTGTTCAAT	59	300
JI 254	F: TTGAGATGCTTTGGGATGGG R: CTTACCAAGACCACTTGAGCA	60	400
JI 250	F: TACTTACGTGTGTGGCATT TTC R: CAGGTGATCAGGTATATTCGTCT	63	300
JI 252	F: TATGCTCAATTTGCATTCCC R: GAACACAATGGAGGATTCTT	54	500
JP 102-1	F: ACTATGCCAAGGTGGCATCTAC R: CCCATTTTGCCCTCCCATCTCTAT	57	400
JM 4.2W3	F: AAACAGTGCCAAAACGGTCAC R: GCTGAAACAGATACGGTCAAACACT	54	700
JM 64	F: ATCAAAGTTCAAGCCTTTTTCG R: GAAAAATAAAGCACGCAAAGCA	57	400

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาทำอิเล็กโทรโฟริซิสใน agarose gel 1เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ (DFLP marker) หรือตัดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสใน 1-1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel (PCR-RFLP marker) ใน 1XTBE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นานประมาณ 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

### 3.5 การตรวจสอบโดยเทคนิค SSCP

นำผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 3-5  $\mu$ l loading buffer (95 เปอร์เซ็นต์ formamide, 0.01 M NaOH, 0.05 เปอร์เซ็นต์ bromphenol blue และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ xylene cyanol 9  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน) นำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีเพื่อให้ดีเอ็นเอคงอยู่ในสภาพสายเดี่ยว ก่อนทำอิเล็กโทรโฟริซิสใน 6 เปอร์เซ็นต์ non-denaturing polyacrylamide gel (SSCP marker) โดยใน 45 ml ของเจล ประกอบด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ acrylamide จำนวน 9 ml 6X TBE buffer (stock 10XTBE: Tris base 108 g, boric acid 55 g และ 500 mM EDTA pH 8.0 40 ml) จำนวน 4.5 ml 10 เปอร์เซ็นต์ ammonium persulphate จำนวน 180  $\mu$ l TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine) จำนวน 36  $\mu$ l และน้ำกลั่น จำนวน 31.5 ml ทำอิเล็กโทรโฟริซิสใน 1XTBE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 300 โวลต์ นาน 3-7 ชั่วโมง ทั้งนี้ระยะเวลาขึ้นอยู่กับความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ แล้วย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรตตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Caetano-Anolles (1997)

### 3. การปลูกทดสอบประเมินผลผลิตในแปลงทดลอง

ลูกผสม F<sub>1</sub> ลูกผสมกลับ (BC) ที่ได้รับการยืนยันความเป็นลูกผสม โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ แล้ว และลูกที่ได้จากการผสมเปิด (OP) นำไปปลูกที่ อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร ซึ่งมีลักษณะเป็นดินเหนียว โดยปลูกห่างกัน 2 x 2 เมตร เพื่อคัดเลือกและนำผลผลิตไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

### 4. การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชที่นำมาผสม ลูก F<sub>1</sub> ลูกผสมกลับ (BC) และลูกที่ได้จากการผสมเปิด (OP) โดยเทคนิค AFLP (Vos *et al.*, 1995)

4.1 ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *Eco*RI ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่มีความถี่ในการตัดต่ำ มีตำแหน่งจดจำขนาด 6 คู่เบส และเอนไซม์ *Mse*I ซึ่งมีความถี่ในการตัดสูง มีตำแหน่งจดจำขนาด 4 คู่เบสแล้วเชื่อมต่อกับปลายดีเอ็นเอด้วย adapter 2 ชนิด คือ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter (ตารางที่ 4)

4.2 preselective amplification ทำการเจือจางดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adapter แล้วลง 10 เท่า ด้วย TE buffer จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะชิ้นที่เชื่อมต่อกับ adapter ที่ถูกต้อง ทั้ง 2 ด้าน (ด้านหนึ่งเชื่อมต่อกับ *Eco*RI adapter และด้านที่เหลือเชื่อมต่อกับ *Mse*I adapter) โดยการนำดีเอ็นเอนี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วย *Eco*RI ไพรเมอร์ และ *Mse*I ไพรเมอร์

ที่ต่ออยู่กับเบส 1 ตัวที่ปลาย 3 (Primer +1)

4.3 Selective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ *EcoRI* ไพรมเมอร์ และ *MseI* ไพรมเมอร์ที่ต่ออยู่กับเบส 3 ตัวที่ปลาย 3 (primer +3) โดยใช้ไพรมเมอร์ดังตารางที่ 3 แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์มาเติม AFLP loading buffer (formamide 98 เปอร์เซ็นต์, 10 mM EDTA, 0.1 เปอร์เซ็นต์ bromophenol และ xylene cyanol 0.1 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 20  $\mu$ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่พร้อมสำหรับเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจล อะครีลาไมด์

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของไพรมเมอร์และ adaptor ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ AFLP เพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่ใช้เป็นพ่อแม่ลูกผสม  $F_1$  และลูกผสมกลับ

ชื่อไพรมเมอร์/ adaptor	ลำดับเบสของ ไพรมเมอร์/ adaptor
<i>EcoRI</i> adaptor	5' -CTCGTAGACTGCGTACC- 3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA- 5'
<i>MseI</i> adaptor	5' -GACGATGAGTCCTGAG- 3' 3'-TACTCAGGACTCAT- 5'
Primer E+1 (E-A)	5' GACTGCGTACCAATTC <u>A</u> 3'
Primer M+1 (M-C)	5' GACTGCGTACCAATTC <u>C</u> 3'
Primer E+3 (E-AAC)	5' GACTGCGTACCAATTC <u>AA</u> C 3'
Primer E+3 (E-ACA)	5' GACTGCGTACCAATTC <u>ACA</u> 3'
Primer E+3 (E-AGG)	5' GACTGCGTACCAATTC <u>AGG</u> 3'
Primer M+3 (M-CAA)	5' GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AA</u> 3'
Primer M+3 (M-CAC)	5' GATGAGTCCTGAGTAAC <u>CAC</u> 3'
Primer M+3 (M-CAG)	5' GATGAGTCCTGAGTAAC <u>CAG</u> 3'
Primer M+3 (M-CAT)	5' GATGAGTCCTGAGTAAC <u>CAT</u> 3'
Primer M+3 (M-CTG)	5' GATGAGTCCTGAGTAAC <u>CTG</u> 3'
Primer M+3 (M-CTT)	5' GATGAGTCCTGAGTAAC <u>CTT</u> 3'

4.4 เตรียม non-denaturing polyacrylamide gel 6 เปอร์เซ็นต์ โดยใน 45 ml ของเจล ประกอบด้วย acrylamide 30 เปอร์เซ็นต์จำนวน 9 ml 6X TBE buffer จำนวน 4.5 ml ammonium persulphate 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 180  $\mu$ l TEMED จำนวน 36 ml และน้ำกลั่น จำนวน 31.5 ml ทำอิเล็กโทรโฟริซิสใน 1XTBE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 1500 โวลต์ โดยทำการ pre-run โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 1500 โวลต์ เป็นเวลา 20-30 นาทีแล้วปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาคูดับฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจลหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-5  $\mu$ l ในแต่ละช่อง เปิดเครื่องโดยใช้แรงเคลื่อนเท่าเดิม คือ 1500 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทั้งนี้ระยะเวลาขึ้นอยู่กับความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ แล้วข้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรตตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Caetano-Anolles (1997) โดยแช่แผ่นเจลที่ติดกระจกด้วย fixative (acetic acid 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที ล้างซ้ำอีกครั้ง 5 นาที นำแผ่นกระจกมาข้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วเพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรตส่วนเกินออก ขย้ายแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย developer (sodium carbonate 2.5 เปอร์เซ็นต์, formaldehyde 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ sodium thiosulfate 0.002 เปอร์เซ็นต์) เมื่อแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน หยุดปฏิกิริยา โดยนำแผ่นเจลใส่ใน stop solution (acetic 5 เปอร์เซ็นต์ และ glycerol 3 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 นาที ผึ่งให้แห้งในอากาศเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

4.5 บันทึกแถบดีเอ็นเอของสบูดำ สบู่แดง ผีนตั้น หนูมานั่งแท่น เข็มปัตตาเวีย ลูก F<sub>1</sub> และลูกผสมกลับที่ปรากฏบนแผ่นเจลแล้วบันทึกเป็นสัญลักษณ์ “1” กับกาเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับกาไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) pc version 2.20 K ซึ่งจะคำนวณความสัมพันธ์แต่ละตัวอย่างแล้วสร้างเป็น dendrogram เพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (clustal analysis) วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของลูก F<sub>1</sub> และลูกผสมกลับเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของสบูดำ เพื่อประเมินจีโนมของสบูดำที่มีในลูก F<sub>1</sub> และลูกผสมกลับ โดยการคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ใช้วิธีของ Sneath และ Sokal (1973) ดังสมการ

$$S_{ij} = a/d / (a+b+c+d)$$

เมื่อ  $S_{ij}$  = ค่า similarity ระหว่างพันธุ์ i และพันธุ์ j

a = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้ง 2 พันธุ์

b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ i แต่ไม่พบในพันธุ์ j

$c$  = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์  $j$  แต่ไม่พบในพันธุ์  $i$

$d$  = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่เกิดขึ้นในทั้ง 2 พันธุ์

นำค่าความเหมือนทางพันธุกรรมดังกล่าวมาสร้างเป็น phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA (Unweighted Paired Group Method with Arithmetic Means) ทดสอบความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่มโดยวิเคราะห์ Mentel's test โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc. กำหนดค่า bootstrap จำนวน 10,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม FreeTree และ กำหนดค่า Polymorphic Information Contents (PICs) ของแต่ละแถบดีเอ็นเอ หรือแต่ละ marker จากสูตร

$$PIC = 1 - \sum P_i^2$$

โดย  $P_i$  คือความถี่ของแอลลีลที่  $i$  ซึ่ง  $P_i$  ประกอบด้วย  $P_a$  (absent allele) และ  $P_p$  (present allele) ค่า PICs เป็นค่าที่บอกโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง ที่เลือกมาแบบสุ่ม และ วิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA) เปรียบเทียบกับ การสร้าง phylogenetic tree

##### 5. การศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) ของพืชที่นำมาผสมและ ลูกผสม ( $F_1$ )

เก็บดอกพืชที่จะศึกษาที่บ้านวันแรก เก็บเรณู (pollen) จากดอกเพศผู้นำมา ย้อมสีด้วย อะซิโตคาร์มิน 1 เปอร์เซ็นต์ บนแผ่นสไลด์ ใช้ไม้เล็กๆ คนให้เรณูกระจายให้ทั่วสีย้อมปิดกระจก cover slide นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูลโดยการสุ่มนับจำนวนเรณูใน 10 fields และ หาค่าเฉลี่ยของเรณูที่ติดสีและไม่ติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เรณูที่ย้อมติดสีแดง เข้มสม่ำเสมอบริเวณส่วนไซโทพลาสซึมและมีรูปร่างกลมไม่บิดเบี้ยวจะเป็นเรณูที่มีชีวิต ส่วนเรณูที่ย้อมไม่ติดสีหรือย้อมติดสีจาง ติดสีไม่สม่ำเสมอ จะเป็นเรณูที่ไม่มีชีวิต (ผ่องพรรณ, 2538) วิเคราะห์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู} = \frac{\text{จำนวนเรณูที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเรณูทั้งหมดที่สุ่มนับ}} \times 100$$

##### 6. การศึกษาการเจริญของหลอดเรณู (pollen tube growth/germination)

นำเกสรเพศเมียที่ทำกรถ่ายเรณูแล้วมาคงสภาพใน 50 เปอร์เซ็นต์ FAA (formalin-acetic-alcohol 18:1:1, ethanol 70 เปอร์เซ็นต์/glacial acetic acid/formaldehyde) ที่เตรียมไว้จากนั้นนำมา ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ 1 N NaOH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (เพื่อให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มและสีซึมเข้าไปได้)

ย้ายเกสรเพศเมียจาก 1N NaOH มาแช่ในน้ำกลั่นอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ย้อมสีด้วย aniline blue 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 5-10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาปิดด้วยกระจกสไลด์แล้วกดเบาๆเพื่อให้เนื้อเยื่อของเกสรเพศเมียแยกออกจากกัน นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope) มีความยาวคลื่นแสง 356 มิลลิเมตร (รมชรีญ, 2542ข)

## 7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

นำผลของสบู่ดำที่แก่จัดมาแกะเมล็ดออก แล้วนำเมล็ดไปชั่งให้ได้ประมาณ 100-200 g นำไปตากแดดให้แห้งแล้วนำเมล็ดส่งไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่โครงการภายใต้ความร่วมมือระหว่าง บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KU Biodiesel-PTT) โดยมีวิธีการดังนี้

การเตรียมตัวอย่าง (AOAC, 2000)

ตัวอย่างที่จะนำมาผ่านกระบวนการ hydrolysis นั้นต้องเป็นเนื้อเดียวกันตลอด และต้องผ่านการบดให้มีขนาดตัวอย่าง < 1mm และชั่งน้ำหนักถูกต้อง 0.1 mg

ขั้นตอนการหาปริมาณไขมัน โดยการย่อย (hydrolysis) ด้วยระบบ Soxtec System 2047 SoxCap

เตรียมกรด hydrochloric 37 เปอร์เซ็นต์ 246 ml ผสมกับน้ำ 754 ml ใส่ flask ขนาด 1,000 ml แล้วนำเมล็ดสบู่ดำมากระเทาะเปลือก ชั่งน้ำหนักเปลือก (g) และชั่งน้ำหนักเนื้อใน (g) แล้วบดเนื้อในด้วยเครื่องบด นำ polyester filter ใสใน SoxCap capsule ชั่งเมล็ดสบู่ดำที่บดแล้วใส่ SoxCap capsule ทั้งหมด 6 capsule แต่ละ capsules น้ำหนัก 1.5 g เติม celite 545 ชั่งใส่ SoxCap capsule ทั้งหมด 6 capsule แต่ละ capsules น้ำหนัก 1 g นำ capsule ไปวางที่ boiling stand เติม acid solution ปริมาตรประมาณ 800 ml นำ boiling stand ที่มี capsule ใสใน beaker แล้วนำ condenser มาวางบน beaker เปิดระบบน้ำ cooling ต้ม reagent ให้เดือดแล้วเริ่มจับเวลาตาม ประมาณ 60 นาที เมื่อย่อยตัวอย่างเสร็จแล้วปิด hot plate และเอา hydrolysis solution ออก โดยใช้ระบบ vacuum และล้างตัวอย่างด้วยน้ำจำนวน 6-7 ครั้ง โดยใช้ระบบ rinsing water นำ boiling stand ที่มี capsule มาวางบนกระดาษทิชชูเพื่อซับน้ำ นำสำลีที่ปราศจากไขมัน มาใส่ด้านบน capsule ย้าย capsule tray ไปยัง drying stand นำไปอบในไมโครเวฟ ไฟปานกลาง ประมาณ 30 นาที นำ paper thimble มาสวมกับ

ปากของ capsule ใช้แทงแก้วเขียวให้ filter ลงไปใน paper thimble นำ adapter มาสวมกับ capsule แล้วนำเข้าเครื่องสกัดน้ำมัน (2050 Soxtec Automatic Extraction)

### วิธีการ สกัด Total fat & oil โดยใช้เครื่อง 2050 Soxtec Automatic Extraction (AOCS, Ba 3-38)

1. เปิดน้ำ cooling ไว้ก่อนการวิเคราะห์ ให้มีอุณหภูมิไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 2 ลิตร/นาที และจะเปิดปิดอัตโนมัติเมื่อเปิด hot plate
2. ชั่งน้ำหนัก extraction cup aluminium (extraction cup weight =  $W_2$ ) ก่อนใส่ solvent (Petroleum ether)
3. นำ adapter มาสวมกับ capsule ที่ได้จากการอบไมโครเวฟในวิธีการ hydrolysis เข้าเครื่องสกัดน้ำมัน ทั้งหมด 6 cup แล้วนำเข้าเครื่องสกัดน้ำมัน (2050 Soxtec Automatic Extraction)
4. จากนั้น นำ extraction cup aluminium ทั้งหมด 6 cup นำเข้าไปใน extraction unit แล้วเติม solvent (Petroleum ether) 40 ml ลงใน extraction cup aluminium ทั้งหมด 6 cup
5. หลังจากนั้น สารที่ละลายได้จะถูกสกัดลงใน solvent ตามขบวนการ 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 ใช้เวลา 20 นาที ขั้นตอนที่ 2 ใช้เวลานาน 40 นาที และขั้นตอนที่ 3 ใช้เวลา 10 นาที รวมถึงการทำ solvent recovery 1 นาที โดยใช้อุณหภูมิของ extraction cup aluminium ไม่เกิน 210 องศาเซลเซียส และติดตั้งอุณหภูมิของเครื่องสกัดน้ำมัน (2050 Soxtec Automatic Extraction) ที่ 135 องศาเซลเซียส
6. ขั้นตอนสุดท้าย นำ extraction cup aluminium ทั้งหมด 6 cup ไปอบในตู้อบ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนัก (extraction cup + residue weight =  $W_3$ )

### หลักการคำนวณ (calculation) (AOCS, Am 5-04)

$$\% \text{Fat} = \frac{W_3 - W_2}{W_1}$$

$W_1$  = น้ำหนักตัวอย่าง Sample weight (g)

$W_2$  = extraction cup weight (g)

$W_3$  = extraction cup + residue weight (g)

#### 8. สถานที่ทำการทดลอง

-ห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จตุจักร กรุงเทพฯ

-แปลงปลูกสบู่ดำ อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัด สมุทรสาคร

#### 9. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลอง ตั้งแต่เดือนมกราคม 2552 สิ้นสุดการทดลองเดือนเมษายน 2555

## ผลและวิจารณ์

### การผสมพันธุ์พืชในสกุล *Jatropha* ที่มีอยู่ในประเทศไทย

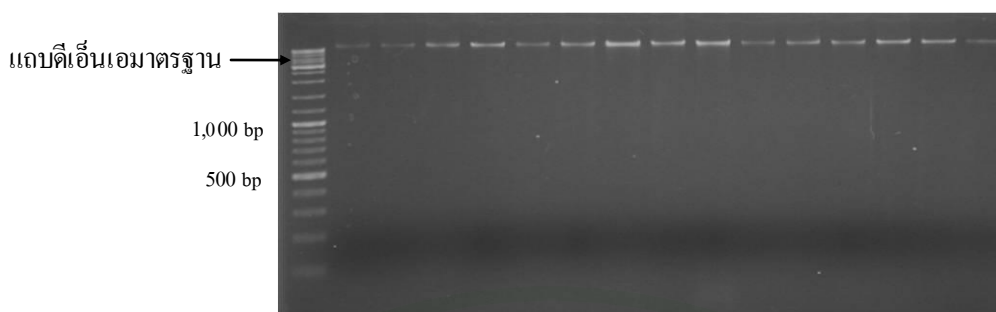
ผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) ระหว่างพืชในสกุล *Jatropha* ที่มีอยู่ในประเทศไทย (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1) ประกอบด้วยการผสมสบู่ดำกับสบู่แดง สบู่ดำกับฝิ่นต้น สบู่ดำกับหนุมานนั่งแท่น สบู่ดำกับเข็มปัตตาเวียดอกสีแดง/ ดอกสีชมพู โดยได้ผสมแบบสายตรง (direct cross) โดยใช้สบู่ดำเป็นแม่และผสมสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) และผสมกลับ (backcross) จัดบันทึกรายละเอียดของการผสม วันที่ผสม จำนวน วนดอกที่ใช้ผสม

สบู่ดำ (*J. curcas* L.)สบู่แดง (*J. gossypifolia* L.)ฝิ่นต้น (*J. multifida* L.)หนุมานนั่งแท่น (*J. podagrica* Hook)เข็มปัตตาเวีย (*J. integririma* Jacq)

### ภาพที่ 1 ตัวอย่างพืชในสกุล *Jatropha* ที่ใช้ในการผสมข้ามชนิด

#### การสกัดดีเอ็นเอจากใบสบู่ดำ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชทั้งตัวอย่างที่เป็นพ่อแม่ และลูกที่ได้จากการผสม จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 260/280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) โดยตัวอย่างทั้งหมดมีค่า  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ระหว่าง 1.8- 1.9 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 genomic DNA ที่สกัดจากใบอ่อนพืชที่ศึกษา

### ลูกที่ได้จากการผสมและการตรวจสอบความเป็นลูกผสม

นำเมล็ดที่ได้จากการผสมไปเพาะ โดยเลือกเมล็ดจากฝักที่มีสีเหลืองแก่แก่เมล็ดน้ำตาล ซึ่งเป็นระยะแก่เต็มที่ ไม่มีระยะพักตัว แล้วนำไปเพาะในถาดเพาะปลูก เมื่อเริ่มงอกส่วนของใบเลี้ยงคู่ 2 ใบ โผล่พ้นดิน โดยการยึดตัวของส่วนใต้ข้อใบเลี้ยง แล้วจึงย้ายลงปลูกในกระถาง เก็บใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อยืนยันความเป็นลูกผสมก่อนนำไปปลูกในแปลงทดสอบที่อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาครเพื่อศึกษาลักษณะและการติดผล สรุปรจำนวนดอกที่ใช้ผสมและลูกผสม  $F_1$  ที่ได้จากการผสมทั้งสายตรงและสายสลับ ดังตารางที่ 5-6 และภาพที่ 3-6 โดยการตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่างสบูดำกับเข็มปัตตาเวีย สบูดำกับฝิ่นต้น สบูดำกับหนุมานนั่งแท่น ใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *FATA* (*Fatty acid thioesterase A*) ซึ่งจะได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ส่วนการตรวจลูกผสมระหว่างสบูดำกับสบูแดงใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *KASII* (*3-Ketoacyl ACP synthase II*) โดยจะได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 850 คู่เบส ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *FATA* และ *KAS II* นำไปตรวจใน non-denaturing polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอสภาพสายเดี่ยว (SSCP marker) ได้แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่าง สบูดำกับเข็มปัตตาเวีย สบูดำกับฝิ่นต้น สบูดำกับหนุมานนั่งแท่น โดยทั้งสบูดำ เข็มปัตตาเวีย ฝิ่นต้น และหนุมานนั่งแท่น มีแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบ แสดงว่าอัลลีลที่ตำแหน่งนี้น่าจะอยู่ในสภาพ homozygote ยังไม่ได้ลูกผสมระหว่างสบูดำกับสบูแดงจากการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลูกที่ได้จากการผสมทั้งสายตรงและสายสลับโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *KASII* (ภาพที่ 7) และไพรเมอร์จำเพาะกับสบูดำเพื่อติดตามส่วนจีโนมของสบูดำในลูกที่ได้จากการใช้สบูแดงเป็นแม่และสบูดำเป็นพ่อ (ภาพที่ 8)

## ลูกผสม F<sub>1</sub>

ลูกผสม F<sub>1</sub> ทั้ง 12 ต้นซึ่งได้จากการผสมสายตรง (direct cross) 11 ต้น (ตารางที่ 5) และจากการผสมสายกลับ (reciprocal cross) 1 ต้น (ตารางที่ 6) และได้ยืนยันความเป็นลูกผสมโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอแล้ว ประกอบด้วยลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัดตาเวียขอบใบรี เรียบดอกสีแดง 8 ต้น (ภาพที่ 3-4) ลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับฝิ่นต้น 1 ต้น ลูกผสมระหว่างฝิ่นต้นกับสบู่ดำ 1 ต้น และลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับหนุมนั่งแท่น 2 ต้น (ภาพที่ 5-6) ลักษณะเด่นของลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัดตาเวีย คือ สีดอกมีสีขาว และสีชมพูแดง โดยที่สบู่ดำกลีบดอกมีสีเหลืองแกมเขียว เข็มปัดตาเวียกลีบดอกมีสีแดง กลีบดอกของลูกผสมมี 5 กลีบเช่นเดียวกับสบู่ดำและเข็มปัดตาเวีย ขนาดของดอกอยู่ระหว่างดอกสบู่ดำที่ใช้เป็นแม่และเข็มปัดตาเวียดอกสีแดงที่ใช้เป็นพ่อ เช่นเดียวกับขนาดใบที่มีขนาดอยู่ระหว่างขนาดของสบู่ดำที่มีขนาดใหญ่กว่าและใบของเข็มปัดตาเวียที่มีขนาดเล็กกว่า ลูกผสมที่ได้รูปแบบของใบมีลักษณะเป็น 3-5 หยัก ที่ฐานใบมีลักษณะตัดเด่นชัด ใบมีสีเขียว ลูกผสมบางต้นด้านล่างใบจะมี pigment สีแดงเห็นชัดเจน ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายกับเข็มปัดตาเวียที่ใบด้านล่างมี pigment สีแดง ลักษณะของลำต้นลูกผสมสบู่ดำกับเข็มปัดตาเวียที่ได้ทั้งหมดมีลักษณะและสีคล้ายกิ่งไม้เนื้อแข็ง ลูกผสมจะออกดอกเมื่ออายุประมาณ 4-6 เดือน ยกเว้นลูกผสม #137\* จากแม่สบู่ดำหัวหิน ไม่มีพืษ กับพ่อเข็มปัดตาเวีย ที่ออกดอกเร็ว อายุประมาณ 3 เดือน และ ลูกผสม #13\* จากแม่สบู่ดำสหรัฐ 8.45 kr กับพ่อเข็มปัดตาเวีย ออกดอกช้า อายุประมาณ 7 เดือน ลูกผสมส่วนใหญ่จะให้ช่อดอกต่อเนื่องเรื่อยๆ ดอกเพศเมียจะบานก่อน ในวันที่ 1-3 แล้วดอกเพศผู้จึงบานในวันที่ 3 หรือ 4 เป็นต้นไป ในแต่ละช่อดอก ดอกจะบานเป็นเวลาหลายวัน ตั้งแต่ 9-34 วัน เฉลี่ยประมาณ 14 วัน ลูกผสมทั้ง 8 ต้นมีอัตราส่วนเฉลี่ยดอกเพศเมีย: ดอกเพศผู้ = 1:12.2 (580:7086 จาก 73 ช่อดอกที่ศึกษา) เมื่อเปรียบเทียบกับเบื้องต้นกับอัตราส่วนดอกเพศเมีย: ดอกเพศผู้ ของสบู่ดำ = 1:16.3 (36:587) และ เข็มปัดตาเวียดอกแดง = 1:7 (5:35) ใน 1 ช่อดอกจะมีดอกเพศเมีย 5-10 ดอก การติดผลของลูกผสม F<sub>1</sub> ก่อนข้างต่ำ ในแต่ละช่อดอกติดผลเพียง 1-2 ผล ส่วนใหญ่ผลจะพ้อและร่วงไป ซึ่งน่าจะเป็นผลจากโครโมโซมต่างชนิดในลูกผสม ขนาดของผลลูกผสมเล็กกว่าสบู่ดำ ผลแก่ของ ลูกผสม F<sub>1</sub> มีลักษณะแตกและเมล็ดติดไปไกล (violently dehiscent capsules) เหมือนที่พบในเข็มปัดตาเวีย Pathiban *et al.* (2009) รายงานการผสมระหว่างสบู่ดำและเข็มปัดตาเวียพบว่าลูก F<sub>1</sub> ให้ผลผลิตต่ำ เมื่อผสมกลับ (backcross) หลายๆชั่ว (generation) ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะเด่น ผลผลิตมีแนวโน้มสูงขึ้น

ลูกผสม F<sub>1</sub> สบู่ดำกับหนุมนั่งแท่น 2 ต้นมีลักษณะที่ คล้ายกัน คือมีลักษณะใบหยัก 3-5 พู สีเขียว ลักษณะระหว่างสบู่ดำและหนุมนั่งแท่น ตำแหน่งก้านใบเชื่อมกับแผ่นใบอยู่เยื้องไปทางกลางใบเหมือนหนุมนั่งแท่นและมีลำต้นเดี่ยว มีดอกสีชมพู ออกดอกแต่ลักษณะของดอกไม้

สมบูรณร่วงง่ายและไม่ติดเมล็ด แต่เมื่อนำตามาติดบนต้นสบู่ดำที่มีรากและตอใหญ่การเจริญเร็ว และสมบูรณ์กว่าต้นที่มีรากเดิม ออกดอกบ่อยขึ้นและได้ผสมกลับไปที่สบู่ดำ ยังไม่ติดผล ลูกผสม  $F_1$  สบู่ดำกับฝิ่นต้น 2 ต้นมีลักษณะที่คล้ายกัน คือมีลักษณะใบหยัก 7 พูกลี สีเขียว ลักษณะระหว่าง สบู่ดำและฝิ่นต้น มีดอกสีชมพู ออกดอกแต่ดอกไม่สมบูรณ์ร่วงง่ายและไม่ติดเมล็ดเช่นเดียวกับลูก  $F_1$  สบู่ดำกับหนุมานนั่งแท่น เมื่อนำตามาติดบนต้นสบู่ดำ การเจริญเร็วขึ้นและออกดอกบ่อยขึ้น ได้ผสมกลับไปที่สบู่ดำ แต่ยังไม่ติดผล ส่วนลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับสบู่แดง ยังไม่ได้ลูกผสมที่ได้รับการยืนยันโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายดีเอ็นเอ (ภาพที่ 7-8)

ตารางที่ 5 สรุปผลการผสมสายตรง (direct cross) ข้ามชนิด ระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย/ หนุมานนั่งแท่น/ สบู่แดง/ ฝิ่นต้น และลูกผสมที่ได้

การผสมระหว่าง (direct cross)	จำนวน ดอกที่ใช้ผสม	จำนวน ผล ที่ได้	จำนวน เมล็ดที่ได้	จำนวน เมล็ด ที่งอก	จำนวน ลูกผสม ที่ยืนยันแล้ว
สบู่ดำ x เข็มปัตตาเวีย	148	36 (24.3%)	71	34 (47.9%)	8(#5*,12*,13*,21*,35*,36*,47*,137*)
สบู่ดำ x หนุมานนั่งแท่น	156	23 (14.7%)	35	29 (82.8%)	2 (#242*, 253*)
สบู่ดำ x สบู่แดง	65	15 (23.1%)	34	13 (38.2%)	-
สบู่ดำ x ฝิ่นต้น	63	6 (9.5%)	9	7 (77.8%)	1 (#192*)

\* ลูกผสมแสดงลักษณะระหว่างพ่อกับแม่และได้รับการยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ตารางที่ 6 สรุปผลการผสมสายสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) ข้ามชนิด ระหว่างสนุ่ดำกับ  
 เข้มปัตตาเวีย/ หนุ่มานั่งแทน/ สนุ่แดง/ ฝิ่นต้น และลูกผสมที่ได้

การผสมระหว่าง (reciprocal cross)	จำนวน ดอกที่ ใช้ผสม	จำนวน ผลที่ได้	จำนวน เมล็ดที่ได้	จำนวน เมล็ดที่งอก	จำนวนลูกผสม ที่ยืนยันแล้ว
เข้มปัตตาเวีย x สนุ่ดำ	234	-	-	-	-
หนุ่มานั่งแทน x สนุ่ดำ	73	-	-	-	-
สนุ่แดง x สนุ่ดำ	323	10 (3.1%)	22	7 (31.8%)	-
ฝิ่นต้น x สนุ่ดำ	22	1 (4.5%)	1	1 (100%)	1 (#189*)

\* ลูกผสมแสดงลักษณะระหว่างพ่อแม่และได้รับการยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมาย  
 ดีเอ็นเอ



5\* (สนุ่ดำคินเค็ม X เข้มแดง)



12\* (สนุ่ดำUS 8.45 X เข้มแดง)



13\* (สนุ่ดำUS 8.45 x เข้มแดง)



21\* (KUBP80/3 x เข้มแดง)

ภาพที่ 3 ลูกผสม F<sub>1</sub> สนุ่ดำกับเข้มปัตตาเวียจำนวน 8 ต้น



35\* (สบู่ดำมูกดาหาร 10 x เข้มแดง)



36\* (สบู่ดำมูกดาหาร 10 x เข้มแดง)



47\* (สบู่ดำKUBP16 X เข้มแดง)



137\* (สบู่ดำ สุขสันต์หัวหิน ไม่มีพิษ x เข้มแดง)

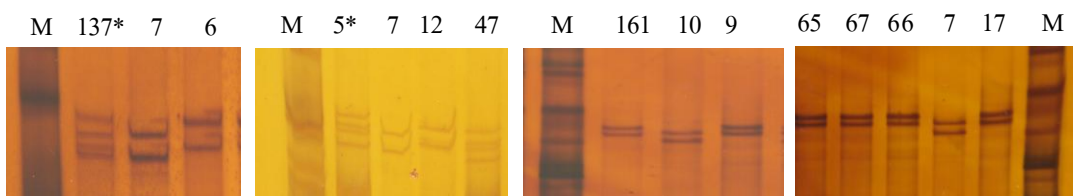
ภาพที่ 3 (ต่อ)

M 4 7 13\* 12\* 11 7 36\* 35\* 9 7 21\* 14 7 170 169 168



M = DNA ladder      14 = สบู่ดำ สุขสันต์      136\* (มูกดาหาร 10kr x เข้มแดง)  
 4 = สบู่ดำ สหรัฐ 8.45 kr      12\* (สบู่ดำสหรัฐ 8.45 kr x เข้มแดง)      168 (สุขสันต์ 1 x เข้มแดง)  
 7 = เข้มแดง      13\* (สบู่ดำสหรัฐ 8.45 kr x เข้มแดง)      169 (สุขสันต์ 1 x เข้มแดง)  
 9 = สบู่ดำ KUBP 80-3      21\* (KUBP 80-3 x เข้มแดง)      170 (สุขสันต์ 1 x เข้มแดง)  
 11 = สบู่ดำ มูกดาหาร 10kr      35\* (มูกดาหาร 10kr x เข้มแดง)

ภาพที่ 4 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่างสบู่ดำ (แม่) กับ เข้มปัดตาเวีย (พ่อ) จากการใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน *FATA* (\* เป็นลูกผสมจริงเมื่อมีแถบดีเอ็นเอของทั้งพ่อและแม่ร่วมกัน และไม่ใช่ลูกผสมเมื่อมีเฉพาะแถบดีเอ็นเอจากแม่)



M = DNA ladder	17 = สุ่มดำ FF25	67 (สุ่มดำ FF25 x เข้มแดง)
6 = สุ่มดำ หัวหิน ไม่มีพิษ	5* (สุ่มดำ ดินเค็ม x เข้มแดง)	66 (สุ่มดำ FF25 x เข้มแดง)
7 = เข้มแดง	12 = สุ่มดำ ดินเค็ม	137* (หัวหิน ไม่มีพิษ x เข้มแดง)
9 = สุ่มดำ KUBP 80-3	47* (สุ่มดำ KUBP 16 x เข้มแดง)	161 (KUBP 80-3 x เข้มแดง ใบบด)
10 = เข้มแดง ใบบด	65 (สุ่มดำ FF25 x เข้มแดง)	

M 8 10 179 171 172 173 174 175 177 178 180 181 8 10 179 171



M = DNA ladder	172 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)	177 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)
8 = สุ่มดำจิ้น	173 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)	178 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)
10 = เข้มแดง ใบบด	174 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)	179 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)
171 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)	175 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)	180 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)
		181 (สุ่มดำจิ้น x เข้มแดง ใบบด)

ภาพที่ 4 (ต่อ)



189\* (ฝิ่นต้น x อินเดียสุขสันต์)



192\* (สบู่ดำรังสฤษฎ์ 10/1 x ฝิ่นต้น)



242\* (สบู่ดำ 72 x หนุมาน 2)



253\* (สุขสันต์ #6 x หนุมาน)

ภาพที่ 5 ลูกผสม F<sub>1</sub> สบู่ดำกับฝิ่นต้นและฝิ่นต้นกับสบู่ดำ (บน) ลูกผสม F<sub>1</sub> สบู่ดำกับ  
หนุมานนั่งแท่น (ล่าง)

M 33 35 189\* 192\* 34 308 307 15 15 33 35 M 257 256 255 254 33 34 M



M = DNA ladder	189* (ฝิ่นต้น x อินเดียสุขสันต์)	256 (อินเดียสุขสันต์ x ฝิ่นต้น1)
33 = ฝิ่นต้น1	192* (สบู่ดำรังสฤษฎ์ 10/1 x ฝิ่นต้น)	257 (อินเดียสุขสันต์ x ฝิ่นต้น1)
34 = สบู่ดำ อินเดียสุขสันต์	254 (อินเดียสุขสันต์ x ฝิ่นต้น1)	307 (KUBP78-9 x F <sub>1</sub> 192*)
35 = สบู่ดำรังสฤษฎ์ 10/1	255 (อินเดียสุขสันต์ x ฝิ่นต้น1)	308 (KUBP78-9 x F <sub>1</sub> 192*)

ภาพที่ 6 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่างสบู่ดำ (แม่) กับหนุมานนั่งแท่น (พ่อ) สบู่ดำ (แม่)  
กับ ฝิ่นต้น (พ่อ) และ ฝิ่นต้น(แม่) กับ สบู่ดำ(พ่อ) จากการใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับ  
ยีน *FATA* (\* เป็นลูกผสมจริงเมื่อมีแถบดีเอ็นเอของทั้งพ่อและแม่ร่วมกัน และไม่ใช่'  
ลูกผสมเมื่อมีเฉพาะแถบดีเอ็นเอจากแม่)

38 253\* 242\* 3 M M 36 44 252 45 44 258 259 260 38 39 261 36 44 250 251 M



M = DNA ladder	252 ( สบู่ดำ 72 x หนุ่มาน4)	127 (สบู่ดำ FF25 x หนุ่มาน 1)
38 = สบู่ดำสุขสันต์ #6	253* (สุขสันต์ #6 x หนุ่มาน 3)	128 (สบู่ดำ FF25 x หนุ่มาน 1)
3 = หนุ่มาน3	257 (อินเดียสุขสันต์ x ฟีนตัน1)	129 (สบู่ดำ FF25 x หนุ่มาน 1)
36 = สบู่ดำ 72	258 (สบู่ดำ JD x หนุ่มาน4)	130 (สบู่ดำ FF25 x หนุ่มาน 1)
39 = หนุ่มาน 3	259 (สบู่ดำ JD x หนุ่มาน4)	242* (สบู่ดำ 72 x หนุ่มาน2)
44 = หนุ่มาน 4	260 (สบู่ดำ JD x หนุ่มาน4)	250 (สบู่ดำ 72 x หนุ่มาน4)
	261 (สบู่ดำสุขสันต์ #6 ไร่พิษ x หนุ่มาน3)	(251) 132-3/2 72 x หนุ่มาน4

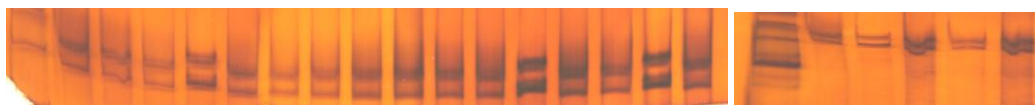
M 3 17 116 119 121 M 38 39 261 20 127 128 126 129 130 M



M = DNA ladder	38 = สบู่ดำ สุขสันต์ #6	121 (สบู่ดำศรีลังกา x หนุ่มาน 1)
3 = หนุ่มานนั่งแท่น	39 = หนุ่มาน 3	126 (สบู่ดำ FF25 x หนุ่มาน 1)
17 = สบู่ดำ FF25	116 (สบู่ดำ D1 อินเดีย x หนุ่มาน 1)	261 (สบู่ดำสุขสันต์ #6 ไม่มีพิษ x หนุ่มาน3)
20 สบู่ดำ ศรีลังกา	119 (สบู่ดำศรีลังกา x หนุ่มาน 1)	

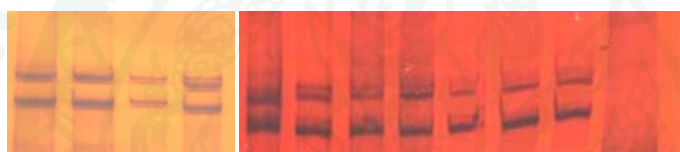
ภาพที่ 6 (ต่อ)

M 238 237 236 43 34 151 150 145 148 149 146 18 13 134 2 9 M 40 43 262 263 264



M = DNA ladder	43 = สบู่แดง 3	151 (KUBP 16 x สบู่แดง 2)
2 = สบู่แดง 1	134 (KUBP 80-3 x สบู่แดง 1)	236 (อินเดีย สุขสันต์ x สบู่แดง 3)
9 = สบู่ดำ KUBP 80-3	145 (KUBP 16 x สบู่แดง 2)	237 (อินเดีย สุขสันต์ x สบู่แดง 3)
13 = สบู่ดำ	146 (KUBP 16 x สบู่แดง 2)	238 (อินเดีย สุขสันต์ x สบู่แดง 3)
18 = สบู่แดง 2	148 (KUBP 16 x สบู่แดง 2)	262 (สบู่ดำ 10-3 x สบู่แดง)
34 = สบู่ดำ อินเดีย สุขสันต์	149 (KUBP 16 x สบู่แดง 2)	263 (สบู่ดำ 10-3 x สบู่แดง 3)
40 = สบู่ดำ รังสฤษฎ์	150 (KUBP 16 x สบู่แดง 2)	264 (สบู่ดำ 10-3 x สบู่แดง 3)

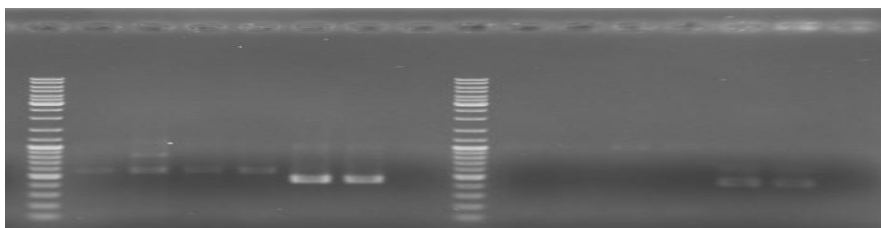
303 302 47 15 9 2 443 444 446 447 449 M



M = DNA ladder	303 (สบู่แดง 4 x KUBP 78-9)
2 สบู่แดง 1	443 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)
9 สบู่ดำ KUBP 80-3 (อ. เมือง จ. พัทลุง)	444 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)
15= สบู่ดำ KUBP78/9	446 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)
47= สบู่แดง 4	447 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)
302 (สบู่แดง 4 x KUBP 78-9)	449 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)

**ภาพที่ 7** การตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่าง สบู่ดำ (แม่) กับ สบู่แดง (พ่อ) และ สบู่แดง (แม่) กับ สบู่ดำ (พ่อ) โดยใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน *KAS II* (\* เป็นลูกผสมจริงเมื่อมีแถบดีเอ็นเอของทั้งพ่อและแม่ร่วมกัน และไม่ใช่อุปการผสมเมื่อมีเฉพาะแถบดีเอ็นเอจากแม่)

M 443 444 446 447 9 9 2 M 443 444 446 447 9 9 2



2 สบู่แดง 1	446 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)
9 สบู่ดำ KUBP 80-3 (อ. เมือง จ. พัทลุง)	447 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)
443 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)	449 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)
444 (สบู่แดง x สบู่ดำ KUBP 80-3)	

**ภาพที่ 8** แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างลูกจากการผสมระหว่างสบู่แดง (แม่) กับสบู่ดำ (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับสบู่ดำ JC 63-1 (ซ้าย) และ JC 2-1 (ขวา)

#### ลูกผสมกลับ BC<sub>1</sub>

ลูกผสม F<sub>1</sub> ระหว่างสบู่ดำและเข็มปัตตาเวียให้ดอกคกแต่การติดผลน้อย ได้ผสมกลับโดยใช้ลูก F<sub>1</sub> เป็นแม่กับสบู่ดำเป็นพ่อ และ สบู่ดำเป็นแม่กับลูก F<sub>1</sub> เป็นพ่อ ได้ลูกจากการผสมกลับ (BC<sub>1</sub>) 18 ต้น (ตารางที่ 7) เป็นลูกผสมกลับ (BC<sub>1</sub>) ที่ได้จากการผสมสบู่ดำกับลูกผสม F<sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข็มปัตตาเวีย) 15 ต้น (ภาพที่ 9) และ F<sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข็มปัตตาเวีย) ผสมกับสบู่ดำ 3 ต้น (ภาพที่ 10) ลูกผสมออกดอกและติดผลดีขึ้น ลูกผสมกลับ BC<sub>1</sub>(201)\* อายุประมาณ 4 เดือนเริ่มออกดอก เป็นลูก BC<sub>1</sub> ที่ออกดอกเร็วที่สุด ดอกมีสีขาวปนชมพูอ่อนรูปประมง ลูกผสมกลับ BC<sub>1</sub>(202)\* ออกดอกดก ลักษณะดอกมีสีเขียวอ่อนรูปประมง ลูกผสม BC<sub>1</sub> ส่วนใหญ่สามารถติดผลได้เมื่อปล่อยให้ผสมเปิด แต่ BC<sub>1</sub>(201)\* และ BC<sub>1</sub>(202)\* ออกดอกบ่อยต่อเนื่อง ลูกผสม BC<sub>1</sub> 295\* ได้จาก F<sub>1</sub> 35\* x สบู่ดำพิชัย ไม่มีพิษ ให้ผลที่มีก้านยาวคล้ายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อ ลูกผสม BC<sub>1</sub> 197\* ออกดอกคกแต่ติดผลน้อย ลูกผสม BC<sub>1</sub> ที่มีผลดก ได้แก่ BC<sub>1</sub>(202\*), BC<sub>1</sub>(196) และ BC<sub>1</sub>(217\*) แต่ BC<sub>1</sub>(196) และ BC<sub>1</sub>(217\*) ผลมีน้ำหนักเบา ผลของลูก BC<sub>1</sub> ทุกต้นเหมือนสบู่ดำ คือผลแตกแต่เมล็ดไม่ติดออกจากผล

ในการตรวจสอบยืนยันความเป็นลูกผสมกลับโดยเฉพาะที่ใช้สบู่ดำเป็นแม่กับลูก F<sub>1</sub> เป็นพ่อซึ่งจำเป็นต้องใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอยืนยันความเป็นลูกผสมกลับ จะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSCP ที่จำเพาะกับยีน *FATA* (ภาพที่ 11) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ DFLP ที่จำเพาะกับพันธุ์เข็มปัตตาเวีย (ภาพที่ 12) เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSCP ที่จำเพาะกับยีน *FATA* เป็น co-dominant marker

ถ้ามีรูปแบบของยีนหรือแอลลีลที่ต่างกันระหว่างพ่อและแม่จะสามารถใช้ในการตรวจสอบยืนยัน ความเป็นลูกผสม  $F_1$  ได้ดี แต่อาจไม่สามารถใช้ยืนยันความเป็นลูกผสมกลับ ( $BC_1, BC_2, \dots$ ) ได้ เนื่องจากการติดตามยีนเพียงตำแหน่งเดียวในจีโนม การผสม  $F_1$  (สบู่ดำ-เข้มปัดดาเวีย) หรือ  $BC_1$  กับสบู่ดำ จึงมีโอกาสเป็นไปได้ที่จะพบเฉพาะแอลลีลของสบู่ดำแบบเดียวในลูกผสมกลับ ( $BC_1, BC_2, \dots$ ) โดยเฉพาะใน generation หลังๆของการผสมกลับ ( $BC_2, BC_3, \dots$ ) เนื่องจากจีโนมของเข้มปัดดาเวียจะเหลือน้อยไปเรื่อยๆ เช่นสมมุติให้ที่ตำแหน่งที่ตรวจสอบในสบู่ดำมี genotype เป็น AA ส่วนเข้มปัดดาเวียเป็น aa ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอมีขนาดไม่เท่ากันภายหลังจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ทั้งโดยเทคนิค DFLP ซึ่งเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอใน agarose gel หรือโดยเทคนิค SSCP ซึ่งเปรียบเทียบทั้งขนาดและลำดับเบสของดีเอ็นเอสภาพสายเดี่ยวใน non-denaturing polyacrylamide gel ลูกผสมจากพ่อแม่คู่นี้จะมี genotype เป็น Aa และเมื่อผสมกลับไปที่สบู่ดำ AA ผลการผสมกลับ ( $BC_1$ ) ก็จะได้ AA และ Aa ในอัตรา 1:1 จึงมีโอกาสได้ลูกผสมกลับ ( $BC_1$ ) ที่มีทั้ง 2 แอลลีลเหมือน สบู่ดำ และลูกผสมกลับที่มีแอลลีลหนึ่งเหมือนสบู่ดำและอีกแอลลีลหนึ่งเหมือนเข้มปัดดาเวีย อย่างไรก็ตามเนื่องจากการผสมกลับ ( $BC_1$ ) นี้มีการใช้ทั้งลูกผสม  $F_1$  เป็นแม่และสบู่ดำเป็นแม่ หากใช้สบู่ดำเป็นแม่เมื่อเกิดการผสมตัวเองในต้นแม่ก็จะทำให้ได้ทั้ง 2 แอลลีลเป็นเหมือนสบู่ดำด้วย ทำให้การตรวจสอบลูกผสมกลับแท้จริงไม่ชัดเจน โดยเฉพาะเมื่อตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพียงตำแหน่งเดียวเพื่อให้มีความชัดเจนในการยืนยันความเป็นลูกผสมกลับจึงต้องใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอหลายตำแหน่งในการตรวจสอบ ดังเช่นการใช้เครื่องหมาย DFLP จำเพาะกับพันธุ์เข้มปัดดาเวีย หลายๆ ตำแหน่งเพื่อช่วยยืนยันความเป็นลูกผสมกลับร่วมกับการดูลักษณะ (phenotype) ของลูกผสมกลับที่ได้

ตารางที่ 7 สรุปผลการผสมกลับ (backcross) รุ่นที่ 1

การผสมระหว่าง (backcross)	จำนวนดอกจำนวน ที่ใช้ผสม ผลที่ได้	จำนวน เมล็ด เมล็ดที่ได้	จำนวน เมล็ด ที่งอก	จำนวนลูกผสม ที่ยืนยันแล้ว
สบู่ดำ x F <sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข้ม)	162 32 (19.8%)	74	58 (78.4%)	15 (#195*, 196, 197*, 198*, 199*, 200, 201*, 202*, 217*, 270*, 616, 635*, 651, 652, 653)
F <sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข้ม) x สบู่ดำ	465 10 (2.1%)	10	3 (30%)	3 (#271, 279*, 295*)

\* ลูกผสมแสดงลักษณะระหว่างพ่อกับแม่และได้รับการยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

195\* (KUBP 78-9 x F<sub>1</sub>,12\*)196 (KUBP 78-9 x F<sub>1</sub>,12\*)ภาพที่ 9 ลูกผสมกลับ (BC<sub>1</sub>) ระหว่าง สบู่ดำ (แม่) กับ F<sub>1</sub>(สบู่ดำ – เข้มปัตตานี) (พ่อ)

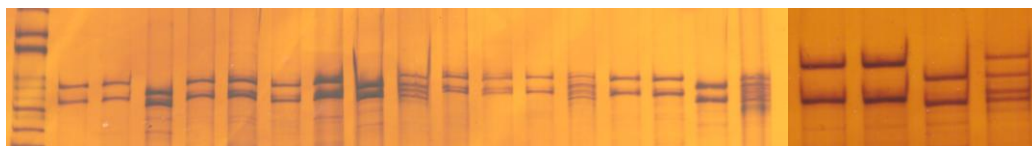
198\* (สบู่ดำ72 x F<sub>1</sub>137\*)200 (สบู่ดำ72 x F<sub>1</sub>137\*)201\* (สบู่ดำ72 x F<sub>1</sub>137\*)202\* (สบู่ดำ72 x F<sub>1</sub>137\*)217\* (KUBP 80-3 x F<sub>1</sub>12\*)270\* (KUBP80-3 x F<sub>1</sub>137\*)

### ภาพที่ 9 (ต่อ)

271 (F<sub>1</sub>21\* x สบู่ดำสุขสันต์ 1) 279\* (F<sub>1</sub>21\* x Suriname) 295\* (F<sub>1</sub>35\* x วิชานูเมตี้ด 2 ไร่พิษ)

### ภาพที่ 10 ลูกผสมกลับ (BC<sub>1</sub>) ระหว่าง F<sub>1</sub> (สบู่ดำ – เข็มปัดตาเวีย) (แม่) กับ สบู่ดำ (พ่อ)

M 22 4 7 195 196 36 6 7 198\* 199 200 201 202\* 9 4 7 217 22 4 7 197\*



M = DNA ladder	195 (KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*)
22 = สนุ่นดำ KUBP 78-9	196 (KUBP 78/9 x F <sub>1</sub> 12*)
4 = สนุ่นดำสหรัฐ 8.45 Kr	197* (KUBP 78/9 x F <sub>1</sub> 12*)
6 = สนุ่นดำ สุขสันต์ หัวหิน (ไร่พิษ)	198* (สนุ่นดำ 72 x F <sub>1</sub> 137*)
7 = เข็มแดง	199 (สนุ่นดำ 72 x F <sub>1</sub> 137*)
9 = สนุ่นดำ KUBP 80-3 (อ. เมือง จ. พัทลุง)	200 (สนุ่นดำ 72 x F <sub>1</sub> 137*)
22 = สนุ่นดำ KUBP 78/9	201 (สนุ่นดำ 72 x F <sub>1</sub> 137*)
36 = สนุ่นดำ 72	202* (สนุ่นดำ 72 x F <sub>1</sub> 137*)

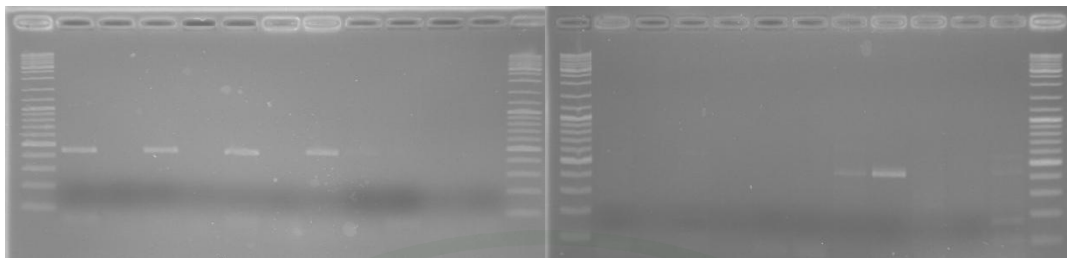
M 270\* 14 9 7 271 23 9 7 279\* M 295\* 7 11



M = DNA ladder	23 = สนุ่นดำ Suriname
7 = เข็มปัตตาเวียดอกแดง	270* (KUBP80-3 x F <sub>1</sub> 137*)
11 = สนุ่นดำ มุกดาหาร 10kr	271 (F <sub>1</sub> 21* x สนุ่นดำสุขสันต์ 1)
9 = สนุ่นดำ KUBP 80-3 (อ. เมือง จ. พัทลุง)	279* (F <sub>1</sub> 21* x Suriname)
14 = สนุ่นดำ สุขสันต์ 1 (ไม่มีพิษ)	295* (F <sub>1</sub> 35* x วิชานูเมลิค 2 ไร่พิษ)

**ภาพที่ 11** การตรวจสอบความเป็นลูกผสมกลับระหว่างสนุ่นดำ (แม่) กับ F<sub>1</sub> สนุ่นดำ – เข็มปัตตาเวีย (พ่อ) และ F<sub>1</sub> สนุ่นดำ – เข็มปัตตาเวีย (แม่) สนุ่นดำ (พ่อ) จากการใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน *FATA* (\* มีแอลลีลของสนุ่นดำและเข็มปัตตาเวีย)

M 195\*196199\*200 201\*271 7 10 20 8 4 M M 195 196 199 200 201 271 7 10 20 8 4 M



M= DNA Ladder	195* (KUBP 78/9 x F <sub>1</sub> 12*)
4 สบู่ดำ สหรั้ว 8.45 kr	196 (KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*)
7 เข็มแดง	199* (สบู่ดำ 72 x F <sub>1</sub> 137*)
8 สบู่ดำ จีน	200 (สบู่ดำ 72 x F <sub>1</sub> 137*)
10 เข็มแดง ใบแดง	201* (สบู่ดำ 72 x F <sub>1</sub> 137*)
20 สบู่ดำ ศรีลังกา	271 (F <sub>1</sub> 21*x สบู่ดำสุขสันต์1)

**ภาพที่ 12** การตรวจสอบความเป็นลูกผสมจากการผสมกลับ (backcross) ระหว่างสบู่ดำ (แม่) กับ ลูกผสม F<sub>1</sub> สบู่ดำ-เข็มปัตตาเวีย (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับเข็มปัตตาเวีย II 1.1B3 (ชาย) และ II 62-1 (ขวา) (\* ยังคงมีแอลลีลของเข็มปัตตาเวีย)

### ลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub> และ BC<sub>3</sub>

ทำการผสมลูกผสมกลับ BC<sub>1</sub> กับสบู่ดำได้ลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub> 100 ต้น (ตารางที่ 8 ภาพที่ 13) ตรวจสอบยืนยันความเป็นลูกผสมโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ (ภาพที่ 14-17) ก่อนนำไปปลูกที่แปลงทดสอบที่อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร บางต้นเริ่มออกดอกและมีช่อดอกดก และเริ่มติดผล เป็นลูกผสมระหว่าง BC<sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข็ม) x สบู่ดำ จำนวน 70 ต้น (#401\*, 402, 403, 409, 410, 411, 412\*, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 452\*, 453, 454, 523, 524, 525, 526, 529, 532, 533, 537, 538, 539, 556, 558, 559, 560, 561, 571, 581, 582, 584, 585, 587, 590, 592, 594, 688, 737, 738, 741, 742, 743, 747, 762, 768, 774, 778, 779, 781, 782, 783, 784, 785, 803, 811, 842, 843, 867, 868, 869, 877, 878, 903, 917, 924, 926) และสบู่ดำ x BC<sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข็ม) จำนวน 30 ต้น (#420\*, 421\*, 423\*, 429\* 432\*, 441\*, 456\*, 457\*, 458\*, 461\*, 462\*, 465\*, 466\*, 467\*, 468\*, 469\*, 470\*, 471, 475\*, 476\*, 477\*, 478\*, 481\*, 482\*, 505\*, 506\*, 507\*, 511\*, 512\*, 513\*) ลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub> (417)\* มีต้นเตี้ยปานกลาง BC<sub>2</sub>409\*, BC<sub>2</sub> 421\* และ BC<sub>2</sub>526\* มีต้นเตี้ย ผลดก ดอกสีเขียวรูปประมง ผลใหญ่ BC<sub>2</sub>467 มีผลขนาดใหญ่ปานกลาง BC<sub>2</sub>561 ดอกดกและไม่เป็นโรคร และ BC<sub>2</sub>539

มีต้นเดียว ก้านใบแดง เริ่มได้ลูกจากการผสมกลับรุ่นที่ 3 (BC<sub>3</sub>) 20 ต้น (ตารางที่ 8) การผสมติดเมล็ดเริ่มมากขึ้นใน generation หลังๆ ของการผสมกลับ

ตารางที่ 8 สรุปผลการผสมกลับ รุ่นที่ 2 และ 3 (BC<sub>2</sub> และ BC<sub>3</sub>)

การผสมระหว่าง (backcross)	จำนวน ดอกที่ ใช้ผสม	จำนวน ผลที่ได้	จำนวน เมล็ดที่ได้	จำนวน เมล็ดที่งอก	จำนวนลูกผสม ที่ยืนยันแล้ว
BC <sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข้ม) x สบู่ดำ	494	71(14.3%)	162	70 (43.2%)	70 (#401*, 402, 403, 409, 410, 411, 412*, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 452*, 453, 454, 523, 524, 525, 526, 529, 532, 533, 537, 538, 539, 556, 558, 559, 560, 561, 571, 581, 582, 584, 585, 587, 590, 592, 594, 688, 737, 738, 741, 742, 743, 747, 762, 768, 774, 778, 779, 781, 782, 783, 784, 785, 803, 811, 842, 843, 867, 868, 869, 877, 878, 903, 917, 924, 926

ตารางที่ 8 (ต่อ)

การผสมระหว่าง (backcross)	จำนวน ดอกที่ ใช้ผสม	จำนวน ผลที่ได้	จำนวน เมล็ดที่ได้	จำนวน เมล็ดที่งอก	จำนวนลูกผสม ที่ยืนยันแล้ว
สบู่ดำ x BC <sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข็ม)	28	22 (78.5%)	61	42 (68.8%)	30 (#420*, 421*, 423*, 429* 432*, 441*, 456*, 457*, 458*, 461*, 462*, 465*, 466*, 467*, 468*, 469*, 470*, 471, 475*, 476*, 477*, 478*, 481*, 505*, 506*, 507*, 511*, 512*, 513*)
BC <sub>2</sub> (สบู่ดำ-เข็ม) x สบู่ดำ	25	11 (44%)	27	20 (74%)	20 (# 690, 691, 692, 693, 695, 786, 787, 788, 827, 828, 830, 831, 833, 834, 836, 837, 838, 839, 915, 916)

\* ลูกผสมแสดงลักษณะระหว่างพ่อกับแม่และได้รับการยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ



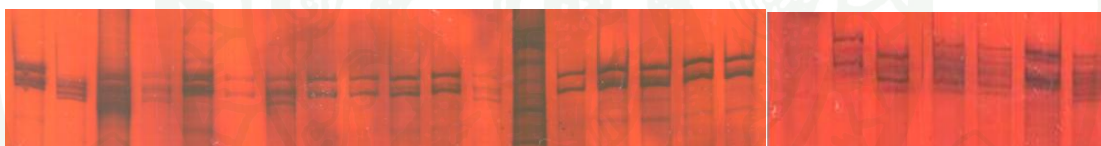
409 (BC<sub>1</sub>202\* x KUBP 73) 417 (BC<sub>1</sub>202\* x อินเดียนสุกสันต์) 422 (อินเดียนสุกสันต์ x BC<sub>1</sub>202\*)



462\*(KUBP 80-3 x BC<sub>1</sub>202\*) 526 (BC<sub>1</sub>202\* x สบู่ดำวิชาญไร้พิษ) 561 (BC<sub>1</sub>202\* x มุกดาหาร 10kr)

ภาพที่ 13 ลูกผสมกลับ (BC<sub>2</sub>) ระหว่าง สบู่ดำ – เข็มปัดตาเวีย

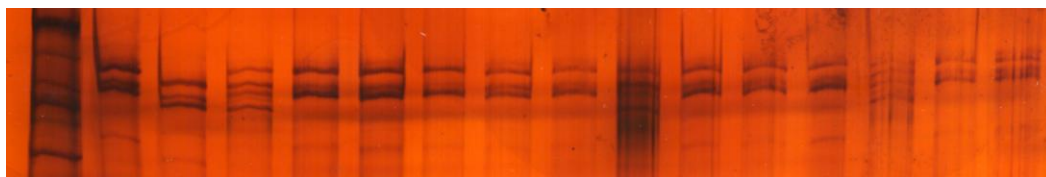
6 7 420\*423\*426 429 432\*435 438 441455 457\*M 478 504 506 508 511 M 6 7 407\* 412\*414 452\*



M= DNA Ladder	423* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	455 (อินเดียนสุกสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)
6 สบู่ดำ อินเดียนสุกสันต์	426 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	457* (อินเดียนสุกสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)
7 เข็มแดง	429 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	478 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
9 สบู่ดำ KUBP 80-3 (อ. เมือง จ. พัทลุง)	432* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	504 (KUBP 73 x BC <sub>1</sub> 198*)
407* (BC <sub>1</sub> 202* x KUBP 73)	435 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	506 (KUBP 73 x BC <sub>1</sub> 198*)
412* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	438 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	508 (KUBP 73 x BC <sub>1</sub> 198*)
414 (BC <sub>1</sub> 202* x อินเดียนสุกสันต์)	441 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	511 (KUBP 73 x BC <sub>1</sub> 198*)
420* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	452* (BC <sub>1</sub> 202* x KUBP 80-3)	

ภาพที่ 14 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของตัวอย่างลูกจากการผสมกลับ (BC<sub>2</sub>) สบู่ดำ (แม่) กับ BC<sub>1</sub> (พ่อ) และ BC<sub>1</sub> (แม่) กับ สบู่ดำ (พ่อ) โดยใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน *FATA* (\* ยังคงมีแอลลีลของเข็มปัดตาเวีย)

M 15 7 421\* 424 429 456 458 461 462\* 464 465 466 467\* 468 469



M= DNA Ladder	461 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
15 สบู่ดำ KUBP 78-9	462* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
7 เข็มแดง	464 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
421* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	465 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
424 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	466 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
429 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	467* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
456 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	468 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
458 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	469 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)

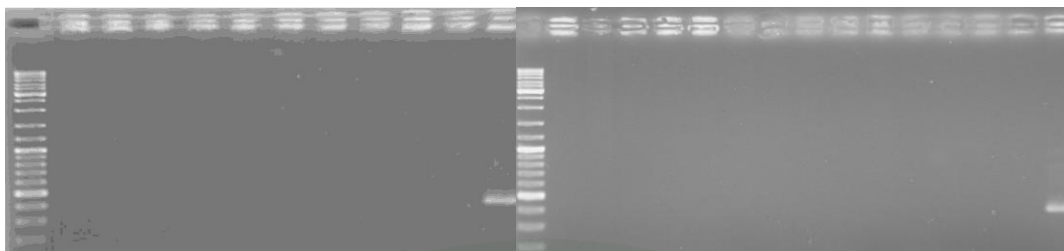
15 7 52 53 505 482 479 477 476 474 471 470 M 513 512 510 507 481\*460 7 15 M



M= DNA Ladder	470 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	481* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
15 สบู่ดำ KUBP 78-9	471 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	482 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
7 เข็มแดง	474 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	505 (KUBP 73 x BC <sub>1</sub> 198*)
52 <i>Jatropha mahafalensis</i>	476 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	507 (KUBP 73 x BC <sub>1</sub> 198*)
53 สบู่ดำพืชรักแดง	477 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	510 (KUBP 73 x BC <sub>1</sub> 198*)
460 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	479 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	512 (KUBP 73 x BC <sub>1</sub> 198*)
		513 (KUBP 73 x BC <sub>1</sub> 198*)

ภาพที่ 14 (ต่อ)

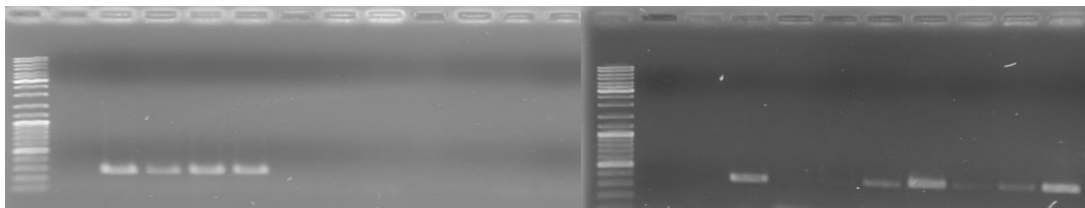
M 420 423 426 429 432 435 438 441 455 6 7 M 457 460 463 466 469 472 475 478 481 504 506 508 511 6 7



M= DNA Ladder	(460) 242-3/1 KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> (202)*
6 สบู่ดำ สุขสันต์ หัวหิน (ไม่มีพีย)	(463) 243-3/1 KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> (202)*
7 เข็มแดง	(466) 244-3/1 KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> (202)*
(420) 227-3/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	(469) 245-3/1 KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> (202)*
(423) 228-3/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	(472) 246-3/1 KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> (202)*
(426) 229-3/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	(475) 247-3/1 KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> (202)*
(429) 230-3/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	(478) 248-3/1 KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> (202)*
(432) 231-3/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	(481) 249-2/1 KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> (202)*
(435) 232-3/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	(504) 260-2/1 KUBP 73 x BC <sub>1</sub> (198)*
(438) 233-3/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	(506) 261-2/1 KUBP 73 x BC <sub>1</sub> (198)*
(441) 234-2/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	(508) 262-3/1 KUBP 73 x BC <sub>1</sub> (198)*
(455) 240-2/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	(511) 263-3/1 KUBP 73 x BC <sub>1</sub> (198)*
(457) 241-3/1 อินเดียสุขสันต์ x BC <sub>1</sub> (202)*	

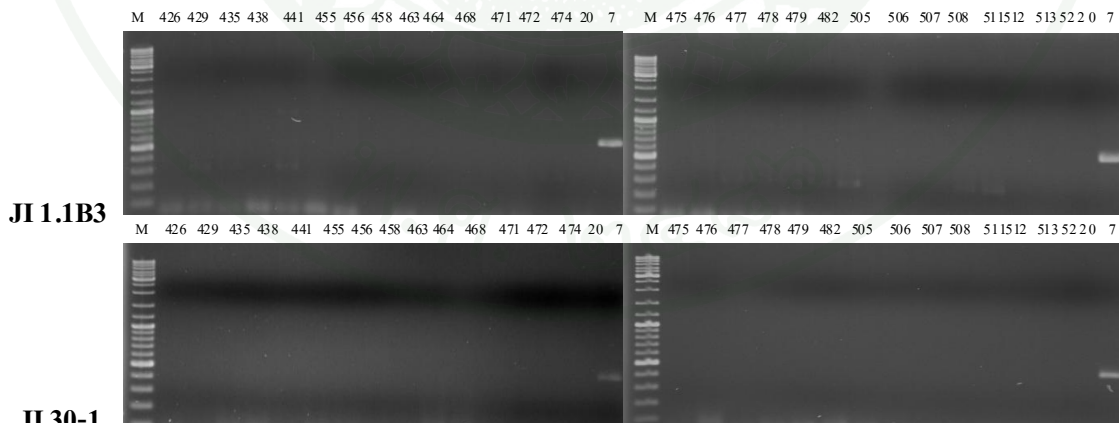
**ภาพที่ 15** แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างลูกจากการผสมกลับ (backcross) ระหว่างสบู่ดำ (แม่) กับลูกผสม BC<sub>1</sub> สบู่ดำ-เข็มปัตตาเวีย (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับเข็มปัตตาเวีย JI 1.1B3 (\* ยังคงมีแอลลีลของเข็มปัตตาเวีย)

M 20 53 7 423\* 423\* 426 429 438 441 455 429 456 M 458 460 461\* 463 464 465\*466\*469\*470\* 7

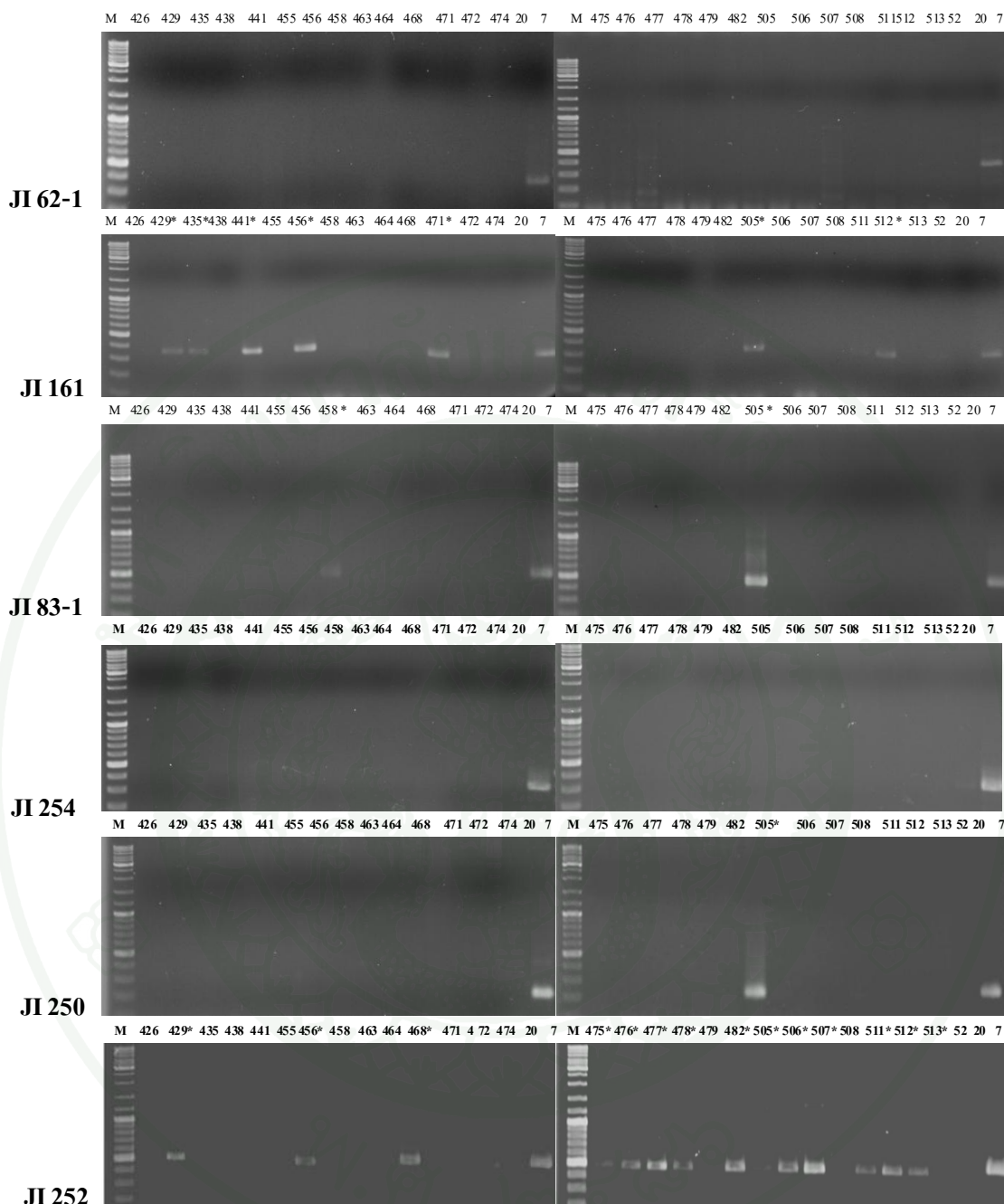


M = DNA Ladder	456 ( อินเดียสูงสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)
7 เข้มแดง	458 ( อินเดียสูงสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)
20 สนุ่นดำ ศรีลังกา	460 ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
53 สนุ่นดำพิชัยลูกแดง	461* ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
423* ( อินเดียสูงสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	463 ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
426 ( อินเดียสูงสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	464 ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
429 ( อินเดียสูงสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	465* ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
438 ( อินเดียสูงสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	466* ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
441 ( อินเดียสูงสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	469* ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
455 ( อินเดียสูงสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	470* ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)

**ภาพที่ 16** แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างลูกจากการผสมกลับ (backcross) ระหว่างสนุ่นดำ (แม่) กับ BC<sub>1</sub> สนุ่นดำ-เข้มนัดตาเวีย (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับเข้มนัดตาเวีย JI250 ( ซ้าย) และ JI161 (ขวา) (\*ยังคงมีแอลลีลของเข้มนัดตาเวีย)



**ภาพที่ 17** แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างลูกจากการผสมกลับ (backcross) ระหว่างสนุ่นดำ (แม่) กับลูกผสม BC<sub>1</sub> สนุ่นดำ-เข้มนัดตาเวีย (พ่อ) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับเข้มนัดตาเวียต่างๆ (\* ยังคงมีแอลลีลของเข้มนัดตาเวีย)



ภาพที่ 17 (ต่อ)

7 เข็มแดง	463 ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	479 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
20 สบู่ดำ ศรีลังกา	464 ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	482* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
52 <i>Jatropha mahafalensis</i>	468*( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	505* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
426 (อินเดียสุยสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	471*( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	506 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
429*(อินเดียสุยสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	472 ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	507 *(KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
435 *(อินเดียสุยสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	474 ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	508 (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
438 (อินเดียสุยสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	475* ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	511 *(KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
441* (อินเดียสุยสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	476 *(KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	512* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
455 (อินเดียสุยสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	477 *(KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	513* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)
456 *(อินเดียสุยสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)	478* ( KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	
458* (อินเดียสุยสันต์ x BC <sub>1</sub> 202*)		

### ลูกที่ได้จากการผสมเปิด (open pollination, OP) และกลุ่มผสมอื่น

นอกจากนี้ได้รวบรวมลูกที่ได้จากการปล่อยผสมเปิดของลูกชั่วต่างๆ และกลุ่มผสมอื่น (ภาพที่ 18) จำนวน 136 ต้น โดยได้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมในบางตัวอย่าง (ภาพที่ 19) ซึ่งแบ่งเป็น

#### ลูกผสมเปิดจาก F<sub>1</sub> (O.P.F<sub>1</sub>) 6 ต้น

O.P.F <sub>1</sub> (5)*	#266*, 267
O.P.F <sub>1</sub> (12)*	#937
O.P.F <sub>1</sub> (13)*	#574
O.P.F <sub>1</sub> (36)*	#391*
O.P.F <sub>1</sub> (137)*	#604

#### ลูกผสมเปิดจาก BC<sub>1</sub> (O.P.BC<sub>1</sub>) 78 ต้น

O.P.BC <sub>1</sub> (195)*	#319, 940
O.P.BC <sub>1</sub> (198)*	#357*, 379, 380, 381, 382, 404, 406*
O.P.BC <sub>1</sub> (199)*	#359, 515
O.P.BC <sub>1</sub> (201)*	#662
O.P.BC <sub>1</sub> (202)*	#312, 313, 314*, 367, 368, 369, 371, 372*, 374*, 375, 387, 388*, 483, 484, 485, 486, 487, 489, 490, 492*, 493, 494, 495, 496, 499, 500, 501, 502, 514, 540, 541, 544, 545, 546, 548, 549, 550, 553, 554, 555, 575, 577, 578, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 656, 657, 659, 660

O.P.BC<sub>1</sub>(271) #952,953, 954, 955, 956, 957, 958, 959,960, 962

O.P.BC<sub>1</sub>(295)\* #968, 969, 970

ลูกผสมเปิดจาก BC<sub>2</sub> (O.P.BC<sub>2</sub>) 10 ต้น

O.P.BC<sub>2</sub>(417)\* #941, 942, 944, 945

O.P.BC<sub>2</sub>(556) #986, 987, 988, 989, 990, 991

ลูกผสมเปิดผลแดง (O.P.ผลแดง) 8 ต้น

O.P.ผลแดง (53) #563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570

ลูกผสมเปิดอื่นๆ (O.P.อื่นๆ) 32 ต้น

O.P. (สบูดำ#5) #964, 965, 966, 967

O.P. (265) #399, 400\*

O.P. (266)\* #394\*

O.P. (267) #324, 325, 326

O.P. (371) #676, 677, 679

O.P. (367) #946, 947, 948, 949, 950, 951

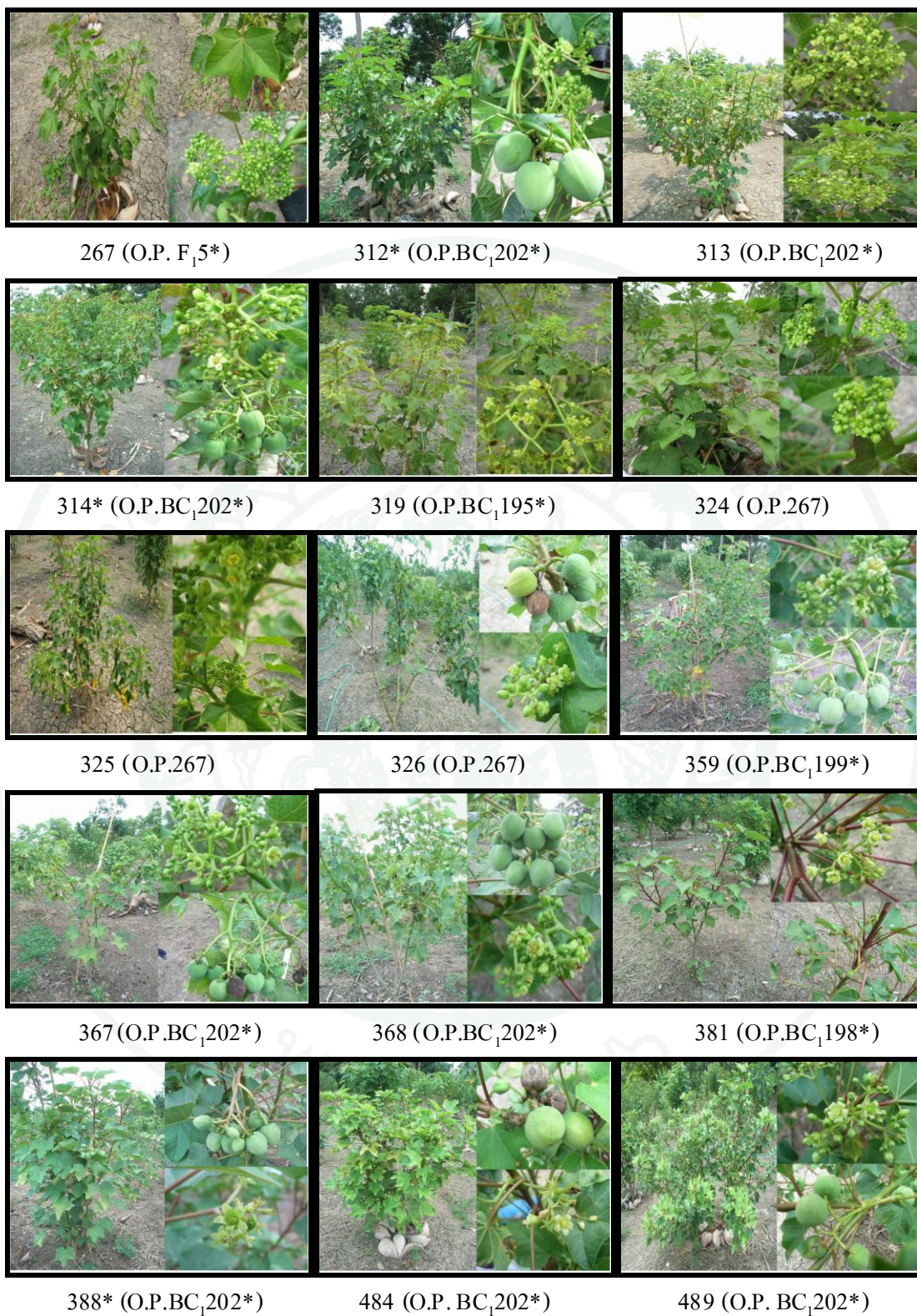
O.P. (495) #928, 931

O.P. (549) #971, 972, 973, 974, 975, 976

O.P. (565) #993, 994, 995, 996

O.P. (568) #977

ลูกผสมจาก BC<sub>1</sub>202\* x F<sub>1</sub> 5\* 2 ต้น #385, 386\*



ภาพที่ 18 ลูกที่ได้จากการผสมเปิด (open pollination)



495 (O.P. BC<sub>1</sub>202\*)

500 (O.P. BC<sub>1</sub>202\*)

501 (O.P. BC<sub>1</sub>202\*)



563 (O.P. ผลแดง)

565 (O.P. ผลแดง)

566 (O.P. ผลแดง)

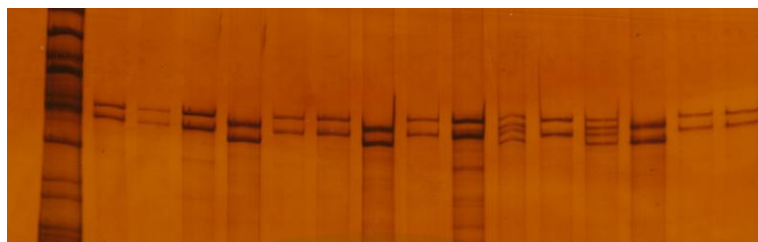


568 (O.P. ผลแดง)

569 (O.P. ผลแดง)

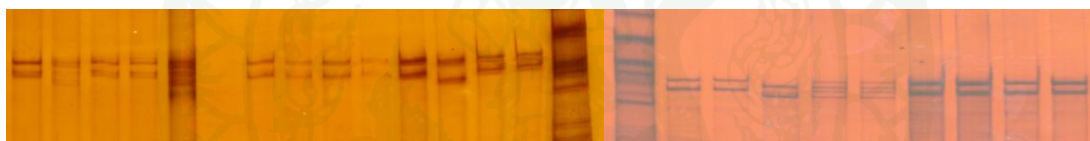
ภาพที่ 18 (ต่อ)

M 326 325 324 7 12 319 7 4 15 314\*313 312\* 7 4 6



M = DNA ladder	312* (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)
6 = สบู่ดำ สุขสันต์ หัวหิน (ไม่มีพิษ)	313 (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)
7 = เข็มปัตตาเวียคอกแดง	314* (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)
4 = สบู่ดำ สหรัฐ 8.45 kr	319 (O.P. BC <sub>1</sub> 195)
12 = สบู่ดำ ดินเค็ม (หนองสรวง อ. ขามทะเลสอ จ. นครราชสีมา)	324 (O.P.267)
15 = สบู่ดำ KUBP 78-9	325 (O.P.267)
	326 (O.P.267)

387 388\*382 381 372\*371 369 368 36 359 7 6 36 M M 36 6 7 357\*374\* 375 379 380 394



6 สบู่ดำ สุขสันต์ หัวหิน (ไม่มีพิษ)	368 (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)	379 (O.P. BC <sub>1</sub> 198*)
7 เข็มแดง	369 (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)	380 (O.P. BC <sub>1</sub> 198*)
36 สบู่ดำ 72	371 (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)	381 (O.P. BC <sub>1</sub> 198*)
357* (O.P. BC <sub>1</sub> 198*)	372* (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)	382 (O.P. BC <sub>1</sub> 198*)
359 (O.P. BC <sub>1</sub> 199*)	374* (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)	387 (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)
367 (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)	375 (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)	388 (O.P. BC <sub>1</sub> 202*)
		394 (O.P. F <sub>2</sub> 266*)

ภาพที่ 19 การตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากการผสมเปิด (OP) ของ BC<sub>1</sub> และอื่นๆ จากการใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน *FATA* (\* มีแอลลีลของเข็มปัตตาเวีย)

### สรุปลักษณะเด่นของลูกผสม

ลูกผสมที่ได้ทั้งหมดมี 286 ต้น ประกอบด้วยลูกผสม F<sub>1</sub> ที่ได้ยืนยันความเป็นลูกผสมโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอแล้ว 12 ต้น ลูกผสม BC<sub>1</sub> 18 ต้น BC<sub>2</sub> 100 ต้น BC<sub>3</sub> 20 ต้น ลูกผสมเปิดของ

ลูกผสมชั่วต่างๆ (OP) 134 ต้น และลูกจากกลุ่มผสม BC<sub>1</sub> x F<sub>1</sub> 2 ต้น พบลักษณะเด่นของลูกผสมต่างๆ เช่น ให้ผลตก ผลใหญ่ ดอกคดต่อเนื่อง ต้นเตี้ย และแสดงแนวโน้มต้านทานโรค ดังตารางที่ 9 ภาพที่ 20 พันธุ์ที่ดีจะถูกคัดเลือกไว้เพื่อนำไปปรับปรุงพันธุ์หรือขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณต่อไป สรุปลักษณะของลูกผสมลักษณะต่างๆดังนี้

ตารางที่ 9 ลักษณะสบูดำและลูกผสมที่มีลักษณะที่ดี

ต้นที่	ได้จาก	ลักษณะ
#367*	OP BC <sub>1</sub> 202*	ดอกสีเขียวอ่อนรูปประฆัง ผลตกใหญ่'ผล BA 80 x 1 = 21 ผลต่อช่อ + ผลเล็ก 12 ผล
#359	OP BC <sub>1</sub> 199*	ต้นสูงปานกลาง ดอกสีเขียวอ่อนรูปประฆัง ผลตกใหญ่'
#526*	BC <sub>1</sub> 202* x วิชาญไร่พิษ	ต้นเตี้ย ก้านช่อผลยาว ผลใหญ่ปานกลาง ผลตก ดอกสีเขียวอ่อนรูปประฆัง
#495	OP BC <sub>1</sub> 202*	ต้นเตี้ย ดอกคดมาก ตอบสนอง BA ดี ผลเล็ก (ติดผลน้อย)
#319	OP BC <sub>1</sub> 195	ต้นเตี้ย แตกกิ่งดี ไม่เป็นโรค (ดอกคดแต่ผลไม่คด)
#467*	KUBP80-3 x BC <sub>1</sub> 202*	ดอกและผลตก
#196	KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*	ดอกและผลตก ต้นสูงปานกลาง ใบสีเขียว ดอกสีเขียว อมขาวรูปประฆัง ตอบสนอง BA ดี (เมล็ดน้ำหนักเบา)
#217*	KUBP 80-3 x F <sub>1</sub> 12*	ดอกและผลตก ดอกสีเขีวอมขาวรูปดาว ตอบสนอง BA ดี (เมล็ดน้ำหนักเบา)
#388*	OP BC <sub>1</sub> 202*	ต้นเตี้ยมาก ผลไม่คด ดอกสีเขียวอ่อนรูปประฆัง ดอกคดปานกลาง
#386*	BC <sub>1</sub> 202* x F <sub>1</sub> 5*	ต้นเตี้ย แตกกิ่งก้านดี ดอกสีขาวรูปประฆัง ก้านช่อผลยาว ผลเล็ก ไม่เป็นโรค
#385	BC <sub>1</sub> 202* x F <sub>1</sub> 5*	ต้นสูง ดอกสีขาวรูปประฆัง ก้านช่อผลยาว ผลเล็ก
#197*	KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*	ดอกคด (ติดผลน้อยมาก)

## ตารางที่ 9 (ต่อ)

ต้นที่	ได้จาก	ลักษณะ
#201*	72 x F <sub>1</sub> 137*	ต้นสูงปานกลาง ดอกดกสีชมพูอมขาว ก้านดอกยาว ไม่เป็นโรค
#417*	BC <sub>1</sub> 202* x มุกดาฯ	ต้นสูงปานกลาง ดอกดกปานกลาง (มีเพ็ชร์แป้ง ผลสุกไม่ พร้อมกัน)
#563	OP ผลแดง	ต้นสูง ไม่เป็นโรค (ผลสุกไม่พร้อมกัน)
#565	OP ผลแดง	ต้นเตี้ย แดกกิ่งก้านดี ไม่เป็นโรค ผลสีเขียว ดอกเขียวอ่อน ใบเล็กผลใหญ่ปานกลาง
#566	OP ผลแดง	ต้นเตี้ย ไม่เป็นโรค ผลสีม่วง ดอกชมพูอ่อน ลำต้นอ่อนก้าน ใบสีแดง ใบเล็ก ผลเล็ก
#568	OP ผลแดง	ต้นเตี้ย ไม่เป็นโรค ผลสีม่วง ดอกชมพู ลำต้นอ่อนก้านใบสี แดง ใบเล็ก ผลเล็ก
#569	OP ผลแดง	ต้นเตี้ย ไม่เป็นโรค ผลสีม่วง ดอกชมพู ลำต้นอ่อนก้านใบสี แดง ใบเล็ก ผลเล็ก
#295*	F <sub>1</sub> 35* x วิชาญไรรพีช	ผลยาวมีเหลี่ยม ก้านช่อยาว
#267	OP F <sub>1</sub> 5*	ผลยาวรี ลักษณะต้นดี
#312*	OP BC <sub>1</sub> 202*	ต้นสูงปานกลาง ดอก (ไม่ต้านทานโรค ติดผลน้อย)
#313	OP BC <sub>1</sub> 202*	ต้นสูงปานกลาง ดอกดก (ไม่ต้านทานโรค ติดผลน้อย)
#314*	OP BC <sub>1</sub> 202*	ต้นสูงปานกลาง ดอกดก (ไม่ต้านทานโรค ติดผลน้อย)
#324	OP 267	ต้นเตี้ย ดอกรูประฆัง ผลใหญ่ปานกลาง
#409	BC <sub>1</sub> 202* x 73	ต้นสูงปานกลาง ดอกสีเขียวรูประฆัง ผลใหญ่ปานกลาง
#561	BC <sub>1</sub> 202* x มุกดาฯ	ต้นสูง ผลใหญ่ดก ไม่เป็นโรค
#324	OP 267	ต้นเตี้ย ดอกรูประฆัง ผลใหญ่ปานกลาง
#409	BC <sub>1</sub> 202* x 73	ต้นสูงปานกลาง ดอกสีเขียวรูประฆัง ผลใหญ่ปานกลาง
#561	BC <sub>1</sub> 202* x มุกดาฯ	ต้นสูง ผลใหญ่ดก ไม่เป็นโรค
#489	OP BC <sub>1</sub> 202*	ต้นเตี้ย ผลเล็ก ตอบสนอง BA ดี

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ต้นที่	ได้จาก	ลักษณะ
#501	OP BC <sub>1</sub> 202*	ต้นเดี่ยว ดอกคก (เหมือน #495) (ติดผลน้อย)
#500	OP BC <sub>1</sub> 202*	ต้นเดี่ยว ดอกสีเขียวอ่อนรูประฆัง ดอกคก (เหมือน #495) ผลใหญ่ด้านทานโรค
#368	OP BC <sub>1</sub> 202*	ต้นเดี่ยว แตกกิ่งก้านดี ดอกคกปานกลาง ผลใหญ่ปานกลาง
#616	KUBP20 x F <sub>1</sub> 13*	ไม่เป็นโรค ใบสีแดง
#490	OPBC <sub>1</sub> 202*	ไม่เป็นโรค
ผลแดง	คุณพิชัย	ต้นเดี่ยว ไม่เป็นโรค ดอกและผลคก ผลแดงม่วง

สรุปพันธุ์สบูดำ ที่ได้จากการผสมกลับและผสมเปิดตามลักษณะได้ดังนี้

ผลคก	#367* (OPBC <sub>1</sub> 202*), #BC <sub>2</sub> 467* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*), # 359 (OPBC <sub>1</sub> 199*), # BC <sub>2</sub> 526 (BC <sub>1</sub> 202* x วิชาญ), # BC <sub>1</sub> 196* (KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*), BC <sub>1</sub> 217* (KUBP 80-3 x F <sub>1</sub> 12*)
ต้นเดี่ยว	#388 (OPBC <sub>1</sub> 202*), #319 (OPBC <sub>1</sub> 195*), #386 (BC <sub>1</sub> 202* x F <sub>1</sub> 5*), # BC <sub>2</sub> 526 (BC <sub>1</sub> 202* x วิชาญ), #495 (OPBC <sub>1</sub> 202*), #569 (OP ผลแดง),
ไม่เป็นโรค	#490 (OPBC <sub>1</sub> 202*), #386 (BC <sub>1</sub> 202* x F <sub>1</sub> 5*), #569 (OP ผลแดง), #319 (OPBC <sub>1</sub> 195*),
ดอกคก	# BC <sub>1</sub> 197* (KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*), #495 (OPBC <sub>1</sub> 202*), #312 (OPBC <sub>1</sub> 202*), #313 (OPBC <sub>1</sub> 202*), #BC <sub>1</sub> 202* (72 x F <sub>1</sub> 137*), # BC <sub>1</sub> 201* (72 x F <sub>1</sub> 137*)



196\* (KUBP 78-9 x F<sub>1</sub>12\*) 197\* (KUBP 78-9 x F<sub>1</sub>12\*) 201\* (สบูดำ 72 x F<sub>1</sub>137\*)



202\* (สบูดำ 72 x F<sub>1</sub> 137\*) 217\* (KUBP 80-3 x F<sub>1</sub>12\*) 295\* (F<sub>1</sub>35\* x วิชานูเมล็ด 2 ไร่พิษ)



319 (O.P.BC<sub>1</sub>195\*)

325 (O.P.267)

359 (O.P.BC<sub>1</sub>199\*)



367 (O.P.BC<sub>1</sub>202\*)

386\* (BC<sub>1</sub> 202\* x F<sub>1</sub> 5\*)

388\* (O.P.BC<sub>1</sub>202\*)



495 (O.P. BC<sub>1</sub>202\*)

526 (BC<sub>1</sub>202\* x สบูดำวิชานูไร่พิษ)

569 (O.P.ผลแดง)

ภาพที่ 20 ลูกผสมกลับ (BC) และลูกผสมเปิด (OP) ที่มีลักษณะเด่น

## การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

คัดเลือกตัวอย่างจำนวน 14 ตัวอย่าง ที่มีลักษณะดีจากแปลงทดสอบ เป็นลูกที่ได้จากการผสมกลับ ( $BC_1$ ) ลูกที่ได้จากการผสมเปิด (O.P. $BC_1$ ) และสบู่อำพันธ์ KUBP 78-9 พันธุ์ผลดก จากโครงการ KU Biodiesel เป็นตัวเปรียบเทียบ นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน ความชื้น และอัตราส่วนเนื้อในต่อเปลือก (ตารางที่ 10) โดยในทุกตัวอย่างมีอัตราส่วนน้ำหนักของเนื้อในมากกว่าเปลือก ยกเว้นตัวอย่างที่  $BC_1$ 196 ที่อัตราส่วนน้ำหนักเนื้อในน้อยกว่าเปลือกมาก ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณน้ำมันที่ได้น้อยกว่าตัวอย่างอื่นคือ 29.92 เปอร์เซ็นต์ ในส่วน kernel โดยในตัวอย่างที่  $BC_1$ 202\* พบว่ามีปริมาณน้ำมันมากที่สุดคือ 50.93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสบู่อำพันธ์ KUBP 78-9 ที่มีปริมาณน้ำมันเท่ากับ 49.12 เปอร์เซ็นต์ เล็กน้อย ปริมาณน้ำมันเฉลี่ยที่พบในตัวอย่างทั้ง 14 ตัวอย่าง คือ 43.90 เปอร์เซ็นต์ ใน kernel Adebawale และ Adedine (2006) ได้ศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของสบู่อำพันธ์ พบว่ามีปริมาณน้ำมันในเมล็ด 66.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าในสบู่อำพันธ์ที่เขยรายงานโดย De Oliveira *et al.* (2009) ได้ศึกษาลักษณะและองค์ประกอบของน้ำมันสบู่อำพันธ์และสบู่อำพันธ์ พบว่าสบู่อำพันธ์มีปริมาณน้ำมัน 31.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสบู่อำพันธ์มีปริมาณน้ำมัน 23.9 เปอร์เซ็นต์ ผืนต้นเป็นพืชที่มีปริมาณน้ำมันมากที่สุดคือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับสบู่อำพันธ์ที่มีปริมาณน้ำมัน 23-38 เปอร์เซ็นต์ (Banerji *et al.*, 1985; Sujatha *et al.*, 1996) Subramanian *et al.* (2005) พบว่าปริมาณน้ำมันใน kernel นั้นจะมีมากกว่า คือ 46-58 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณน้ำมันทั้งเมล็ดจะอยู่ที่ 30-40 เปอร์เซ็นต์ Raja *et al.* (2011) ศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากสบู่อำพันธ์ พบว่าสบู่อำพันธ์ 12 กิโลกรัม จะได้น้ำมัน 3 ลิตร ที่ความชื้น 6.2 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 18 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 38 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 17 เปอร์เซ็นต์ ไฟเบอร์ 15.5 เปอร์เซ็นต์ ซีลีล่า 5.3 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำมันประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ในเมล็ดซึ่งเป็นไขมันอิ่มตัว 21 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่อิ่มตัวถึง 79 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันจำนวน 14 ตัวอย่าง\*

รายชื่อ	อัตราส่วน 100 กรัม เนื้อใน:เปลือก	ความชื้น (%)	% Total Fat&Oil (เนื้อใน +เปลือก)	% Total Fat&Oil (เนื้อใน)
BC <sub>1</sub> 196 (KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*)	38.47:61.53	11.08	12.74	29.92
BC <sub>1</sub> 202*(สบู่อำ172 x F <sub>1</sub> 137*)	64.72:35.28	7.49	33.67	50.93
#367* (O.P.BC <sub>1</sub> 202*)	64.35:35.65	7.18	32.59	49.54
สบู่อำ KUBP 78-9	60.12:39.88	8.49	30.33	49.12
สบู่อำผลแดง	60.30:39.70	10.36	28.04	45.18
สบู่อำ#6	57.78:42.22	9.36	26.87	45.04
BC <sub>1</sub> 217* (KUBP 80-3 x F <sub>1</sub> 12*)	52.88:47.12	9.09	22.80	41.34
#267 (O.P.F <sub>1</sub> 5*)	51.25:48.75	8.72	19.64	36.43
BC <sub>1</sub> 295* (F <sub>1</sub> 35* x วิชาญไร่พิษ)	60.04:39.96	8.54	26.66	43.07
#314* (O.P.BC <sub>1</sub> 202*)	65.15:34.85	8.34	29.65	44.44
#319 (O.P.BC <sub>1</sub> 195*)	55.19:44.81	8.90	24.75	43.23
#359 (O.P.BC <sub>1</sub> 199*)	57.03:42.97	8.69	26.40	44.78
BC <sub>2</sub> 403 (BC <sub>1</sub> 199* x อินเดียนสุกสันต์)	60.44:39.56	8.66	28.49	45.83
BC <sub>2</sub> 467* (KUBP 80-3 x BC <sub>1</sub> 202*)	63.08:36.92	8.99	29.60	45.76

\*ได้รับความอนุเคราะห์วิเคราะห์ตัวอย่าง โดยโครงการ KU Biodiesel

#### การศึกษาผลการให้สาร BA (N<sub>6</sub>- Benzyladenine) แก่สบู่อำเบื้องต้น

N<sub>6</sub>- Benzyladenine (BA) เป็นฮอร์โมนสังเคราะห์ประเภท cytokinin มีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการเจริญและการพัฒนาของพืช เร่งดอกและเพิ่มการติดผล มีรายงานว่า BA ช่วยเพิ่มจำนวนดอกของ *Lilium speciosum* (Ohkawa, 1979) และ *jojoba* (*Simmondsia chinensis*) (Ravetta and Palzkill, 1992; Prat et al., 2008) และยังช่วยเพิ่มจำนวนดอกต่อช่อของสบู่อำอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับสาร BA ที่ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) นอกจากนี้ BA ยังกระตุ้นให้สบู่อำเกิดดอกแบบกระเทย (bisexual flower) และเพิ่มอัตราส่วนดอกเพศเมีย: ดอกเพศผู้

เป็นผลให้จำนวนผลเพิ่มขึ้น 4.5 เท่า และผลผลิตโดยรวมเพิ่มขึ้น 3.3 เท่า (Pan and Xu, 2011) จากข้อมูลดังกล่าว จึงได้ทดลองให้สาร BA แก่สนุ่นดำและลูกผสมเบื้องต้น รวม 4 การทดลอง เพื่อดูการตอบสนองต่อสาร BA ของสนุ่นดำและลูกผสม เพื่อการเพิ่มผลผลิตในอนาคต การให้สาร BA ใช้วิธีการพ่นสารผสมสารจับใบอัตรา 4 ml/ 20 L ด้วยกระบอกฉีดน้ำที่ช่อดอกและบริเวณโดยรอบช่อดอกขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ช่อดอกละประมาณ 5 ml ได้ทดลองพ่นสาร 4 การทดลองและเช็คผลการตอบสนองจากขนาดช่อดอกเบื้องต้น โดยการประเมินด้วยสายตาโดยได้ทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ให้ BA 80 ppm 1 และ 2 ครั้ง และการให้ BA 160 ppm 1 และ 2 ครั้ง โดยฉีดวันละครั้งช่วงเช้า (9-10 น) รวมจำนวน 19 ต้น

การทดลองที่ 2 ให้ BA 80 ppm และ 160 ppm ช่วงเช้า กลางวัน เย็น รวม 3 ครั้ง เป็นเวลา 1 วัน รวมจำนวน 12 ต้น

การทดลองที่ 3 ให้ BA 160 ppm ฉีดเย็น 1 ครั้ง รวมจำนวน 7 ต้น

การทดลองที่ 4 ฉีดพ่น BA ทั้งต้น 1 ครั้ง ที่ 160 ppm รวมจำนวน 6 ต้น และฉีดพ่น BA ทั้งต้น 1 ครั้ง ที่ 80 ppm รวมจำนวน 3 ต้น

การประเมินผลโดยสายตาเบื้องต้น ประกอบภาพที่ 21

1. กรณีฉีดที่ช่อดอกพบช่อดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น จำนวนดอกเพิ่มขึ้น ดอกเพศเมียเพิ่มขึ้น ช่อดอกที่ฉีด BA เจริญเร็วกว่าช่อที่ไม่ได้รับ BA หากต้นมีความสมบูรณ์ผลผลิตก็น่าจะสูงขึ้น

2. พบดอกกระเทยที่มีทั้งเกสรเพศผู้และเพศเมียในบางพันธุ์ที่ได้รับสาร BA เช่น BC<sub>2</sub>17\* เช่นเดียวกับที่รายงาน โดย Pan and Xu (2011)

3. สนุ่นดำแสดงการตอบสนองต่อการให้สาร BA ที่ความเข้มข้น 160 ppm มากกว่า 80 ppm เช่นเดียวกับที่รายงาน โดย Pan and Xu (2011)

4. กรณีฉีดทั้งต้นพบจำนวนช่อดอกเพิ่มขึ้น แต่การคิดผลยังไม่มากในแต่ละช่อ โดยเฉพาะมีต้นขนาดเล็ก ทั้งนี้หากต้นมีความสมบูรณ์ผลผลิตก็น่าจะสูงขึ้น

โดยสรุปพบว่า สาร BA ช่วยเพิ่มจำนวนดอกและดอกเพศเมีย ช่อดอกที่ฉีด BA เจริญเร็วกว่าช่อที่ไม่ได้รับ BA พบดอกกระเทยในบางพันธุ์ที่ได้รับสาร BA สนุ่นดำแสดงการตอบสนองต่อการให้สาร BA ที่ความเข้มข้น 160 ppm มากกว่า 80 ppm

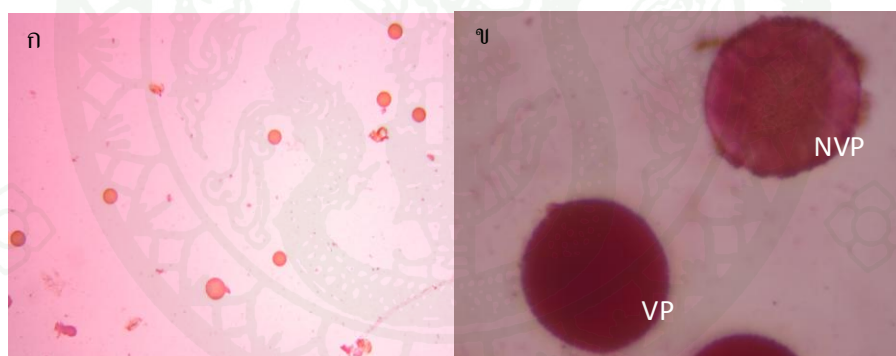
#489 OPBC<sub>1</sub> BA 160 ppm#313 OPBC<sub>1</sub> BA 160#495 OPBC<sub>1</sub> BA 160 ppm ทั้งต้น #217 BC<sub>1</sub> เช้า กลางวัน เย็น 80 ppm ดอก

ภาพที่ 21 ผลการให้สาร BA แก่พืชเบื้องต้น

### การศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen viability)

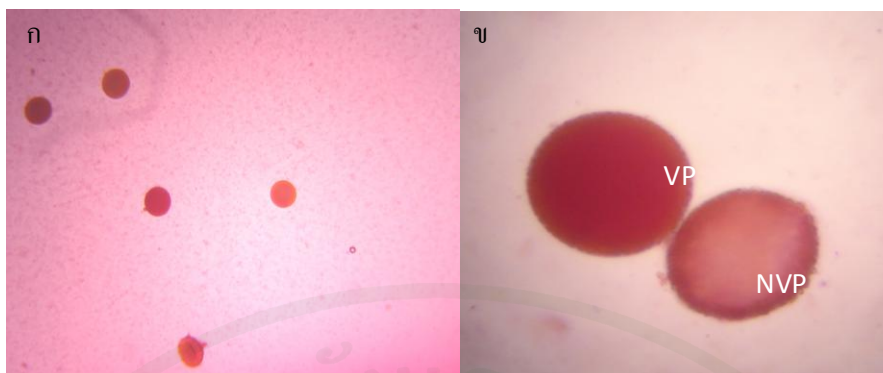
เก็บเรณู (pollen) จากดอกที่บานเต็มที่ นำมาข้อมด้วยอะซิโตคาร์บามีน 1 เปอร์เซ็นต์ บนแผ่นสไลด์ ใช้ไม้เล็กๆ ขยี้เพื่อให้เรณูกระจายทั่วในสี่ข้อม ปิดด้วย cover slide นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 และ 400 เท่า เรณูที่ย้อมติดสีแดงเข้มสม่ำเสมอบริเวณส่วนไซโตพลาสซึมและมีรูปร่างกลมไม่บิดเบี้ยวเป็นเรณูที่มีชีวิต ส่วนเรณูที่ย้อมไม่ติดสีหรือข้อมติดสีจาง ติดสีไม่สม่ำเสมอ เป็นเรณูที่ไม่มีชีวิต (ภาพที่ 22-25) ได้ศึกษาเรณูของเข้มปัตตาเวียดอกสีชมพูและแดง หนุมานนั่งแทน สบู่ดำ และลูกผสม F<sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข้มปัตตาเวีย) #12\* และ #36\* พบความมีชีวิตของเรณูเข้มปัตตาเวียเฉลี่ย 94.08 เปอร์เซ็นต์ หนุมานนั่งแทน 96.95 เปอร์เซ็นต์ สบู่ดำ 92.71 เปอร์เซ็นต์ และลูกผสม F<sub>1</sub> (สบู่ดำ-เข้มปัตตาเวีย) #12\* และ #36\* เฉลี่ย 95.49 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11 ภาพที่ 22-25) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Parthiban *et al.* (2009) รายงานการงอกของเรณู

(pollen germination) ภายหลังจากการป้าย pollens ของสับดูดำ สับดูแดง ผืนต้น หนุมนานั่งแท่น และ เข็มปัดตาเวีย บน stigmas ของสับดูดำ และตรวจสอบการงอกของ pollen tubes ภายใต้วัยกล้องจุลทรรศน์ พบเปอร์เซ็นต์การงอกของ pollens ระหว่าง สับดูดำกับสับดูดำ สับดูดำกับสับดูแดง สับดูดำกับ ผืนต้น สับดูดำกับหนุมนานั่งแท่น สับดูดำกับเข็มปัดตาเวีย คือ 82.46, 48.59, 15.60, 32.96 และ 50.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Sasikala *et al.* (2009) ที่ศึกษาความมีชีวิตของเรณูพืชสกุล *Jatropha* 10 ชนิด และลูกผสมระหว่างสับดูดำกับเข็มปัดตาเวีย โดยใช้ potassium iodide (KI) ย้อม พบ 9 ชนิดมีความมีชีวิตของเรณู มากกว่า 84 เปอร์เซ็นต์ และลูกผสมมีความมีชีวิตของเรณูมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ โดยในสับดูดำพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูมากภายใน 9 ชั่วโมง หลังจากดอกบาน (Luo, 2007) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Aloka (2009) ที่ศึกษาความมีชีวิตของเรณูใน *Trichosanthes dioica* ซึ่งเป็นพืชในสกุลแตงพบว่าภายในวันแรกมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู มากถึง 96.95 เปอร์เซ็นต์และลดลงตามลำดับในวันต่อมา เช่นเดียวกับงานวิจัยของพ่องพรรณ (2538) ที่ศึกษาเรื่องความมีชีวิตของเรณูในบัว พบว่าในวันแรกเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจะสูงถึง 82.73 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเรื่อยๆเช่นกัน โดยความมีชีวิตของเรณูนี้อาจไม่สัมพันธ์กับการผสมติด



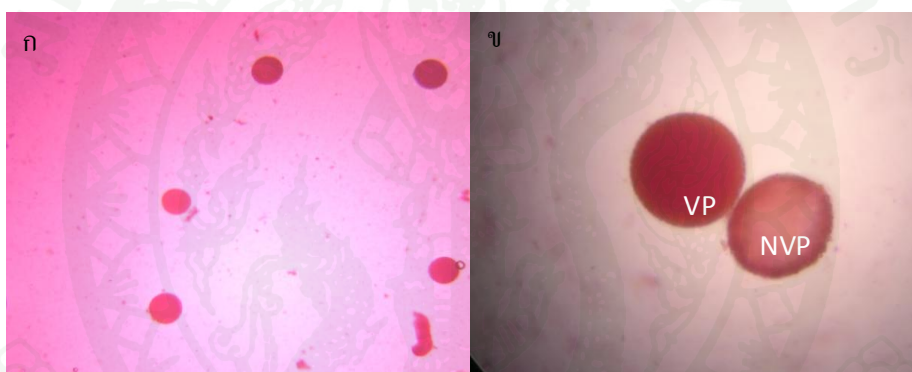
ภาพที่ 22 เรณูเข็มปัดตาเวีย ภายหลังจากการย้อมด้วยอะซีโตคาร์มิน 1 เปอร์เซ็นต์

- ก) เรณูที่มีชีวิต (VP) ที่กำลังขยาย 100 เท่า      ข) เรณูที่มีชีวิต (VP) และไม่มีชีวิต (NVP) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



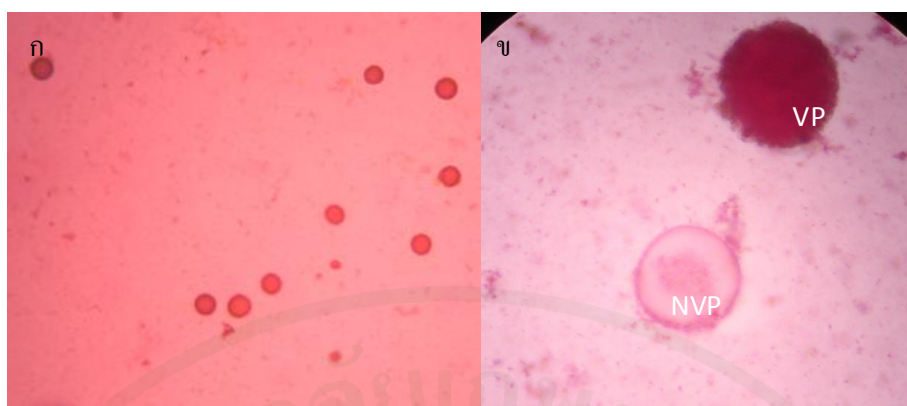
ภาพที่ 23 เรณูหนูมานั่งแทน ภายหลังจากเชื่อมด้วยอะซีโตคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์

ก) เรณูที่มีชีวิต (VP) ที่กำลังขยาย 100 เท่า      ข) เรณูที่มีชีวิต (VP) และไม่มีชีวิต (NVP) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 24 เรณูหนูดำ ภายหลังจากเชื่อมด้วยอะซีโตคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์

ก) เรณูที่มีชีวิต (VP) ที่กำลังขยาย 100 เท่า      ข) เรณูที่มีชีวิต (VP) และไม่มีชีวิต (NVP) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 25 เรณูลูกผสม  $F_1$  ระหว่างสบู่ดำกับเข้มปัตตาเวีย ภายหลังจากการเชื่อมด้วยอะซิโตนคาร์บอน 1เปอร์เซ็นต์

ก) เรณูที่มีชีวิต (VP) ที่กำลังขยาย 100 เท่า      ข) เรณูที่มีชีวิต (VP) และไม่มีชีวิต (NVP) ที่กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 11 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเรณูพ่อแม่และลูกผสม

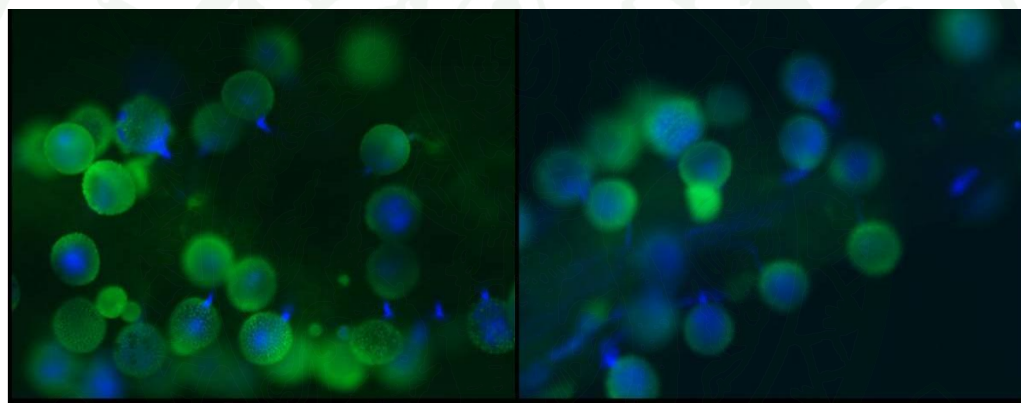
ตัวอย่าง	จำนวน เรณู ทั้งหมดที่ สุ่มนับ	จำนวนเรณูที่ มีชีวิต	% ความมี ชีวิตของ เรณู
เข้มปัตตาเวีย (ชมพู)	65	60	92.31
เข้มปัตตาเวีย (แดง)	273	258	94.50
<b>เฉลี่ยความมีชีวิตของเรณูเข้มปัตตาเวีย</b>	<b>338</b>	<b>318</b>	<b>94.08</b>
หนุมนานิ่งแทน	295	286	96.95
สบู่ดำ	192	178	92.71
$F_1$ 12* สหรัฐ 8.45 kr x เข้มปัตตาเวีย	282	272	96.45
$F_1$ 36* มุกดาหาร 10 kr x เข้มปัตตาเวีย	139	130	93.52
<b>เฉลี่ยความมีชีวิตของลูกผสม <math>F_1</math> (สบู่ดำxเข้มปัตตาเวีย)</b>	<b>421</b>	<b>402</b>	<b>95.49</b>

### การศึกษาการเจริญของหลอดเรณู (pollen tube growth/ germination)

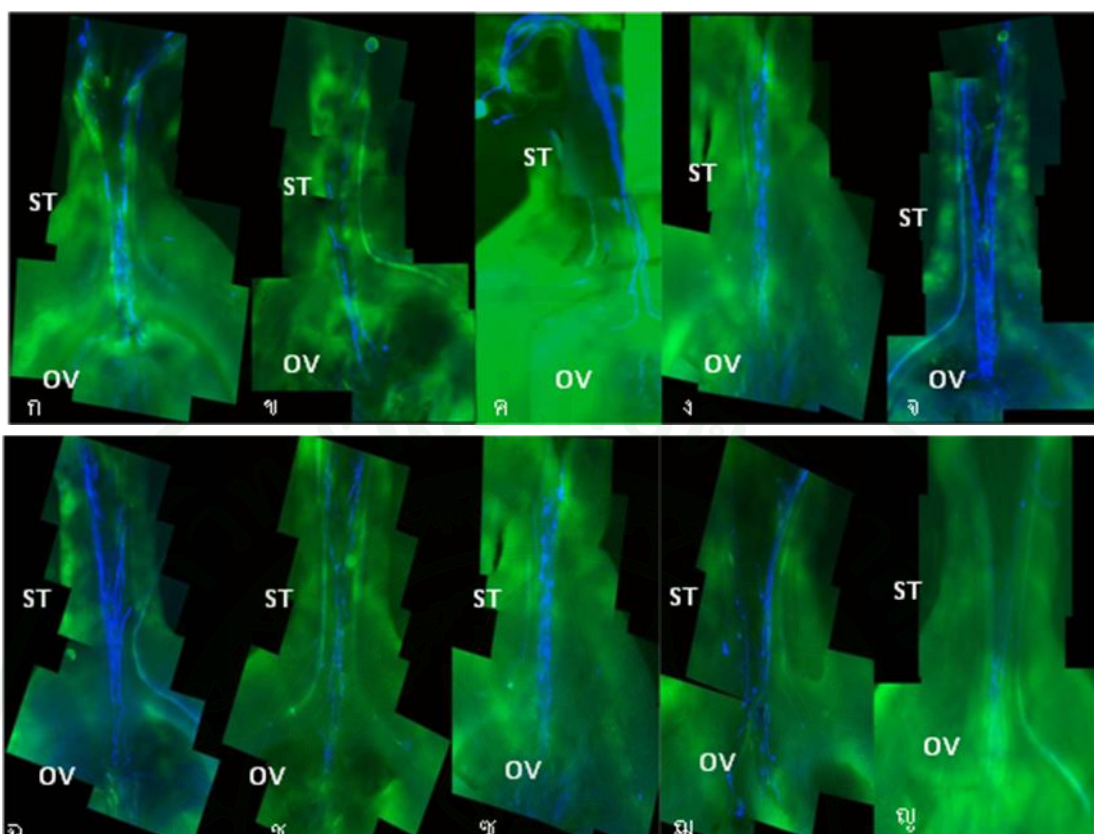
การเจริญของหลอดเรณูไปตามก้านเกสรเพศเมีย (style) โดยได้ทำการทดลองใน 10 คู่ผสม ทั้งการผสมแบบตรงและแบบสลับ (ตารางที่ 12) เกสรตัวเมียและตัวผู้ที่ใช้ประกอบไปด้วย สบู่ดำ เข็มปัดตาเวีย ลูก F<sub>1</sub> และลูกผสมกลับ BC<sub>1</sub> โดยใช้เทคนิคการย้อมด้วยสี aniline blue 0.1 % ภายใต้กล้อง fluorescence พบว่าบริเวณปลายยอดของเกสรตัวเมียมีทั้งเรณูที่งอกและไม่งอกหลอดเรณู เรณูที่มีชีวิตและสามารถงอกหลอดเรณูออกมาทาง germ pore ได้ตามปกติ จะเห็นเป็นหลอดเรณูสีฟ้าเรืองแสง ตัดกับสีของก้านเกสรตัวเมียซึ่งจะเห็นเป็นสีเขียว หลังการถ่ายเรณู 30 นาที พบว่าเรณูมีการงอก (ภาพที่ 26) และเนื่องจาก stigma มีหลายแฉก ทำให้เห็นหลอดเรณูออกจำนวนมาก หลอดเรณูเจริญมาถึงรังไข่ด้วยระยะเวลา 2-4 ชั่วโมง (ภาพที่ 27) ซึ่งจะเห็นเป็นสีฟ้าที่จางลง พบว่ามีจำนวนหลอดเรณูเพียงจำนวนน้อยเท่านั้นที่สามารถเข้ามาถึงรังไข่ เพื่อนำเชื้อเพศผู้เข้าไปผสมกับ egg และ polar nuclei เมื่อหลอดเรณูเพียง 1 อันเข้าไปในอวุล หลอดเรณูอันอื่นจะถูกป้องกันไม่ให้เข้าไป โดยจะมีการสร้างสารประกอบบางอย่างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของหลอดเรณู พร้อมกับการเกิดปฏิสนธิ (Yano *et al.*, 1975) Parthiban (2009) ศึกษาการงอกของหลอดเรณูในพืชสกุล *Jatropha* และพบว่าหลอดเรณูของสบู่ดำสามารถเจริญเข้าไปในรังไข่ของสบู่ดำภายใน 1 ชั่วโมง ส่วนหลอดเรณูเข็มปัดตาเวียสามารถเจริญเข้าไปถึงรังไข่ของเข็มปัดตาเวียในเวลา 2 ชั่วโมง ช่วงเวลาจากเรณูเริ่มงอกหลอดเรณูจนเข้าถึงอวุลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ เช่น ข้าวโพด (*Zea mays*) ใช้เวลา 8 ชั่วโมง (Reger and Jame, 1982) spinach (*Spinacia oleracea* L.) ใช้เวลาประมาณ 10-14 ชั่วโมง (Ramanna and Mutsaerts, 1971 ; Wilm, 1974) การถ่ายเรณูของระกำให้แก๊สละนินวงค์ใช้เวลา 14 ชั่วโมง (รมย์ริณู, 2542ข) แอปเปิ้ล (*Malus pumila* L.) ถ้าผสมข้ามใช้เวลา 4 วัน ถ้าผสมตัวเองใช้เวลา 8-12 วัน (Stott, 1972) นอกจากนี้อัตราการเจริญของหลอดเรณูแปรผันตามความยาวของก้านเกสรเพศเมีย คือ หลอดเรณูจะเจริญได้ช้าในก้านเกสรเพศเมียที่สั้นมากกว่าที่ยาว ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่ก้านเกสรเพศเมียที่สั้นจะมีชั้นที่ผนังแน่น ทำให้หลอดเรณูมีการเจริญช้าลง (Bassiri *et al.*, 1987)

ตารางที่ 12 รายชื่อตัวอย่าง คู่ผสมที่ใช้ในการศึกษาการเจริญของหลอดเรณู

สนุ่นดำ x เข้มปัดตาเวียดอกแดง	เข้มปัดตาเวียดอกแดง x สนุ่นดำ
สนุ่นดำ x F <sub>1</sub> 21* (KUBP 80-3 x เข้มแดงขอบใบเรียบ)	F <sub>1</sub> 21* (KUBP 80-3 x เข้มแดงขอบใบเรียบ) x สนุ่นดำ
สนุ่นดำ x F <sub>1</sub> 35* (มุกดาหาร 10 Kr x เข้มแดงขอบใบเรียบ)	F <sub>1</sub> 35* (มุกดาหาร 10 Kr x เข้มแดงขอบใบเรียบ) x สนุ่นดำ
สนุ่นดำ x BC <sub>1</sub> 196 (KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*)	F <sub>1</sub> 196 (KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*) x สนุ่นดำ
สนุ่นดำ x BC <sub>1</sub> 217* (KUBP 80-3 x F <sub>1</sub> 12*)	BC <sub>1</sub> 217* (KUBP 80-3 x F <sub>1</sub> 12*) x สนุ่นดำ



ภาพที่ 26 เรณูจำนวนมากบน stigma เริ่มงอกหลอดเรณูภายหลังจากการผสมประมาณ 30 นาที



ภาพที่ 27 หลอดเรณูงอกลงมาใน style และรังไข่ ใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง

- |  |  |
|--|--|
| (ก) สนุ่ดำ x เข้มปัดตาเวีย   | (ฉ) F <sub>1</sub> 36* (มุกดาหาร 10 Kr x เข้มแดงขอบใบเรียบ) x สนุ่ดำ |
| (ข) เข้มปัดตาเวีย x สนุ่ดำ   | (ช) สนุ่ดำ x BC <sub>1</sub> 196 (KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*)    |
| (ค) สนุ่ดำ x F <sub>1</sub> 21* (KUBP 80-3 x เข้มแดงขอบใบเรียบ)      | (ซ) สนุ่ดำ x BC <sub>1</sub> 217* (KUBP 80-3 x F <sub>1</sub> 12*)   |
| (ง) สนุ่ดำ x F <sub>1</sub> 36* (มุกดาหาร 10 Kr x เข้มแดงขอบใบเรียบ) | (ฅ) BC <sub>1</sub> 196 (KUBP 78-9 x F <sub>1</sub> 12*) x สนุ่ดำ    |
| (จ) F <sub>1</sub> 21* (KUBP 80-3 x เข้มแดงขอบใบเรียบ) x สนุ่ดำ      | (ญ) BC <sub>1</sub> 217* (KUBP 80-3 x F <sub>1</sub> 12*) x สนุ่ดำ   |

ST = style    OV = ovary

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชที่นำมาผสม ลูก F<sub>1</sub> ลูกผสมกลับ (BC<sub>1</sub>) และลูกที่ได้จากการผสมเปิด โดยเทคนิค AFLP

จากการทดสอบ AFLP ไพรเมอร์ระหว่าง E+3 และ M+3 กับดีเอ็นเอสนุ่ดำได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนจำนวน 11 คู่ (ตารางที่ 13) เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *EcoRI* adapter 3 ไพรเมอร์ และ *MseI* adapter 6 ไพรเมอร์ นำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่างดีเอ็นเอจากสนุ่ดำ เข้มปัดตาเวีย สนุ่แดง หุมนานนั่งแท่น ผืนต้น ลูก F<sub>1</sub> ลูกผสมกลับ (BC<sub>1</sub>) และลูกที่ได้จากการผสมเปิดรวมจำนวน 29 ตัวอย่าง (ตารางที่ 14) แต่ละคู่ไพรเมอร์ที่ศึกษา

พบแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 32-84 แถบ (ภาพที่ 28) ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 622 แถบ เฉลี่ย 56.54 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เป็น polymorphic markers จำนวน 607 แถบ และ monomorphic markers จำนวน 15 แถบ คิดเป็น 97.59 และ 2.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไพรเมอร์ E-ACA/M-CAG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 84 แถบ และไพรเมอร์ E-ACA/M-CAA ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 32 แถบ เปอร์เซ็นต์ polymorphic band ของแต่ละคู่ไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 88.23-100 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 97.16 เปอร์เซ็นต์ ต่อคู่ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ E-AAC/M-CAT, E-AAC/M-CTG, E-ACA/M-CAA และ E-ACA/M-CAG ให้เปอร์เซ็นต์ Polymorphic band 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13)

ค่า PICs ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 622 แถบหรือ markers จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอเอฟแอลพี มีค่าอยู่ในช่วง 0.00-0.49 ค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.1973 เมื่อคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธี Simple Matching ของ Sneath และ Sokal (1973) และนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc-2.20k (ภาพที่ 29) พบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.41-0.99 โดยที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 0.52 สามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของหนุมานนั่งแท่น ฝืนต้นและสบู่แดงกับกลุ่มของสบู่ดำ เข็ม ปัตตาเวียและลูกผสมต่างๆ โดยมีค่า bootstrap สนับสนุนการแบ่งเป็นสองกลุ่ม 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า  $r$  ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.98 และที่ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.76 ยังสามารถแยกสบู่ดำและลูกผสม ลูกผสมกลับและลูกผสมเปิดออกจากพืชชนิดอื่น โดยพบว่า สบู่ดำกับเข็มปัตตาเวียมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากกว่า สบู่ดำกับหนุมานนั่งแท่น สบู่ดำกับสบู่แดง และ สบู่ดำกับฝืนต้น โดยพืชแต่ละชนิดมีความเหมือนกันทางพันธุกรรมกับสบู่ดำ 65, 56, 54 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างออกได้เป็น 9 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ 1 สบู่ดำ (#4, #20) กลุ่มที่ 2 ลูกผสม op  $F_2$ , op  $BC_1$  สบู่ดำ-เข็ม (#319, #325, #348, #359) กลุ่มที่ 3 ลูกผสม  $BC_1$ , op  $BC_1$  สบู่ดำ-เข็ม (#202\*, #217\*, #312\*, #314\*) กลุ่มที่ 4 ลูกผสม  $BC_1$ , op  $BC_1$ , op  $F_1$  สบู่ดำ-เข็ม (#197\*, #198\*, #266\*, #270\*, #357\*) กลุ่มที่ 5 ลูกผสม  $F_1$  สบู่ดำ-เข็ม (#13\*, #21\*, #36\*) กลุ่มที่ 6 ลูกผสม  $BC_1$ , op  $F_1$  สบู่ดำ-เข็ม (#275, #279\*, #295\*) กลุ่มที่ 7 ลูกผสม  $F_1$  สบู่ดำ-หนุมานนั่งแท่น, สบู่ดำ-ฝืนต้น (#189\*, #192\*, #253\*) กลุ่มที่ 8 เข็มปัตตาเวีย (#7, #10) กลุ่มที่ 9 สบู่แดง ฝืนต้น หนุมานนั่งแท่น (#2, #3, #33) โดยพบว่าลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็ม ปัตตาเวียอยู่ในกลุ่มเดียวกับพ่อและแม่ การวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA) ให้ผลที่ชัดเจนสอดคล้องกับ phylogenetic tree โดยที่สบู่ดำและลูกผสม ลูกผสมกลับและลูกที่ได้จากการผสมเปิดอยู่กลุ่มเดียวกันและมีลูกผสมสบู่ดำกับหนุมานนั่งแท่น สบู่ดำกับฝืนต้น เข็มปัตตาเวีย หนุมานนั่งแท่นและฝืนต้น กระจายตัวอย่างชัดเจน โดยมีค่า PCA 1, 2 และ 3 เท่ากับ 35.86, 20.08 และ 14.05 ซึ่งครอบคลุมความแปรปรวนของตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 69.99 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมด (ภาพที่ 30)

Pamidiamarri *et al.* (2008a) รายงานความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) จากเทคนิค RAPD ระหว่างสบู่ดำกับสบู่แดง สบู่ดำกับฝิ่นต้น สบู่ดำกับหนุมนานั่งแทน สบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย คือ 0.46, 0.46, 0.49 และ 0.63 ตามลำดับ และเมื่อใช้เทคนิค AFLP ได้ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 0.45, 0.44, 0.42 และ 0.55 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า สบู่ดำกับเข็มปัตตาเวียมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด น่าจะประสบความสำเร็จในการผสมข้ามพันธุ์มากที่สุด ซึ่งก็ให้ผลสอดคล้องกับผลการผสมจริง พบค่าเฉลี่ยของภาวะพหุสัณฐาน ระหว่างแต่ละสายพันธุ์ 68.48 และ 71.33 เปอร์เซ็นต์โดยเทคนิค RAPD และ AFLP ตามลำดับ ต่อมา Pamidiamarri *et al.* (2008b) ได้ใช้ลำดับเบส ในส่วนของ ITS ของยีน *rRNA* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Jatropha* ก็พบว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับเทคนิค RAPD และ AFLP โดยที่เข็มปัตตาเวียและสบู่ดำมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากที่สุด แต่มีข้อแตกต่างที่หนุมนานั่งแทนถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกับสบู่ดำ โดยก่อนหน้านี้หนุมนานั่งแทนถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกับฝิ่นต้น Dhillon *et al.* (2009) ทำการผสมพันธุ์สบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย พบค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างทั้งสองสายพันธุ์เท่ากับ 41.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างลูกผสมกับพ่อแม่จากการศึกษาของ Vijayanand *et al.* (2009) โดยใช้เทคนิค ISSR ก็พบว่าสามารถแยกพืชสกุล *Jatropha* ออกเป็น 8 กลุ่มโดยให้แอลลิลจำเพาะต่อแต่ละสายพันธุ์ โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสบู่ดำ สายพันธุ์ต่างๆ กลุ่มที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ประกอบด้วย *J. tanjorensis*, *J. gossypifolia*, *J. glandulifera*, *J. podagrica*, *J. ramanadensis*, *J. villosa*, และ *J. integerrima* ตามลำดับ

ตารางที่ 13 ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชที่นำมาผสม ลูก F<sub>1</sub> ลูกผสมกลับ และลูกที่ได้จากการผสมเปิด โดยเทคนิค AFLP และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากแต่ละคู่ไพรเมอร์

คู่ไพรเมอร์	จำนวน bands	จำนวน Polymorphic bands	%polymorphism
E-AAC/M-CAA	78	77	98.71
E-AAC/M-CAC	67	66	98.51
E-AAC/M-CAG	75	74	98.67
E-AAC/M-CAT	34	34	100.00
E-AAC/M-CTG	61	61	100.00
E-AAC/M-CTT	47	44	93.62
E-ACA/M-CAA	32	32	100.00
E-ACA/M-CAG	84	84	100.00
E-ACA/M-CAT	47	45	95.74
E-ACA/M-CTT	34	30	88.23
E-AGG/M-CAG	63	60	95.24
<b>รวม</b>	<b>622</b>	<b>607</b>	<b>เฉลี่ย = 97.16</b>

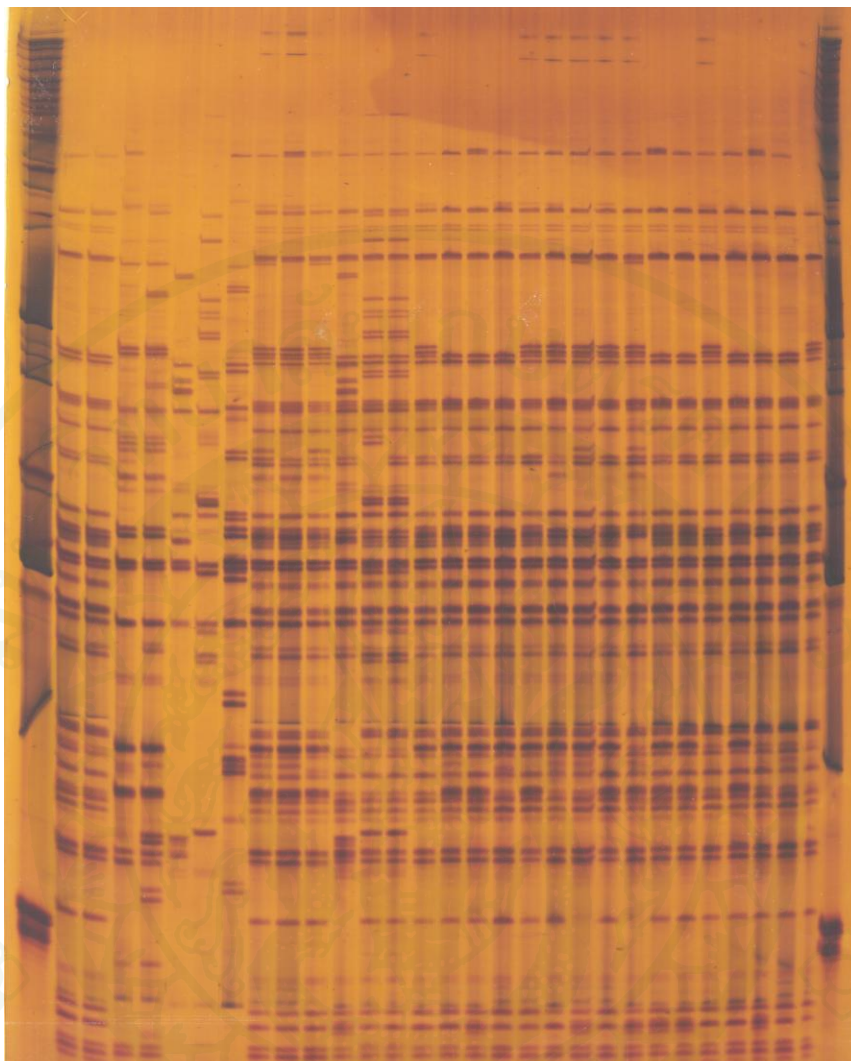
ตารางที่ 14 รายชื่อพืชที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP

หมายเลข	ชื่อ	หมายเลข	ชื่อ
#2	สบู่แดง 1	#217*	F <sub>1</sub> (KUBP 80-3 x F112*)
#3	หนุมานนั่งแท่น 1	#253*	F <sub>1</sub> (สบู่ดำ สุขสันต์ x หนุมานนั่งแท่น3)
#4	สบู่ดำ สหรั้ว 8.45 kr		
#7	เข้มปัตตาเวียดอกแดง	#266*	op F <sub>1</sub> 5*
#10	เข้มปัตตาเวียดอกแดงใบ 3 แฉก	#270*	BC <sub>1</sub> (KUBP80-3 x F1137*)
#20	สบู่ดำ ศรีลังกา	#275	op F113*
#33	ฝิ่นต้น 1	#279*	BC <sub>1</sub> (F121* x Suriname)
#13*	F <sub>1</sub> (สหรั้ว 8.45 kr x เข้มแดงขอบใบเรียบ)	#295*	BC <sub>1</sub> (F135* x วิชาญไร่พิษ)
		#312*	op BC <sub>1</sub> 202*
#21*	F <sub>1</sub> (KUBP 80- x เข้มแดงขอบใบเรียบ)	#314*	op BC <sub>1</sub> 202*
		#319	op BC <sub>1</sub> 195*
#36*	F <sub>1</sub> (มุกดาหาร 10 kr x เข้มแดงขอบใบเรียบ)	#325	op F <sub>2</sub> 267
		#348	op F <sub>2</sub> 265
#189*	F <sub>1</sub> (ฝิ่นต้น x สบู่ดำ อินเดีย สุขสันต์)	#357*	op BC <sub>1</sub> 198*
#192*	F <sub>1</sub> (สบู่ดำ 10/1 x ฝิ่นต้น)	#359	op BC <sub>1</sub> 199*
#197*	BC <sub>1</sub> (KUBP 78-9 x F1 12*)		
#198*	BC <sub>1</sub> (สบู่ดำ 72 x F1 137*)		
#202*	BC <sub>1</sub> (สบู่ดำ 72 x F1 137*)		

\* ตรวจสอบยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

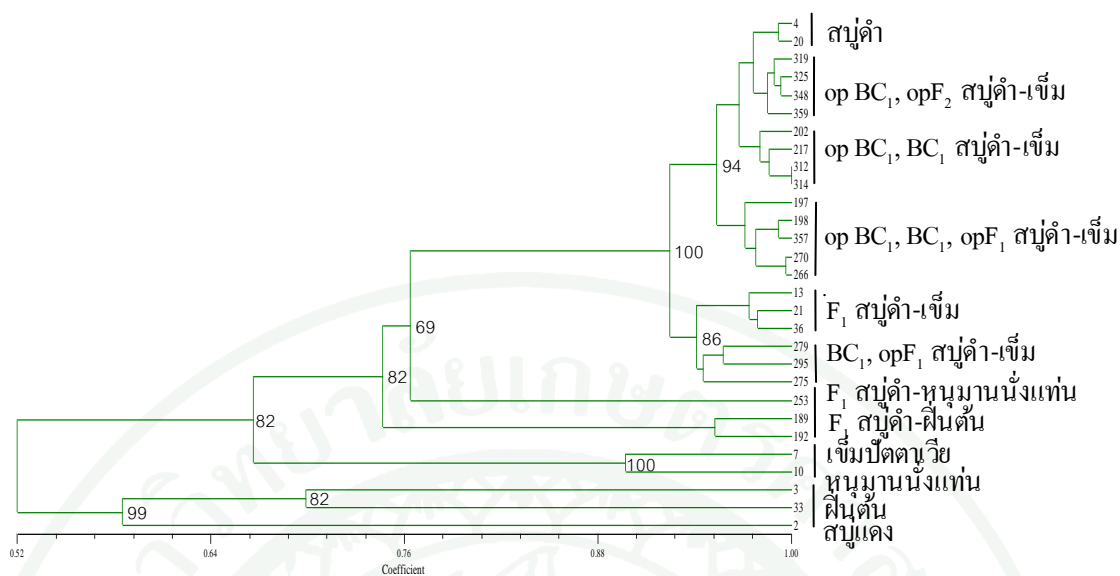
op = open pollinated

M 4 20 7 10 3 33 2 3 21 36 253 189 192 197 198 202 217 270 279 295 266 275 312 314 319 357 359 325 348 M

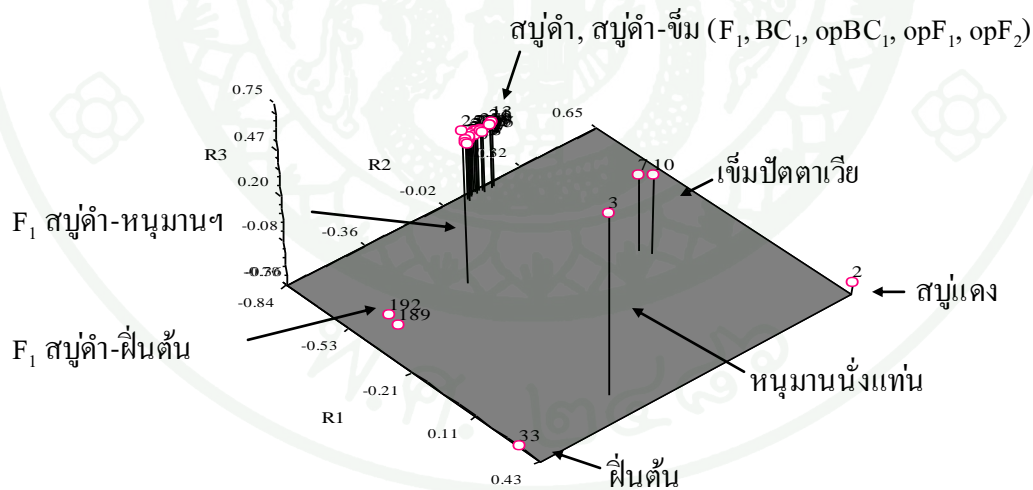


E-AAC และ M-CAT

ภาพที่ 28 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชที่นำมาผสมและลูกผสมที่ได้



ภาพที่ 29 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูป phylogenetic tree ของพืชที่นำมาผสมและลูกผสมที่ได้ ได้แก่ สบู่ดำ สบู่แดง ผีนตั้น หนุมนานั่งแทน เข้มปัดตาเวีย และลูกผสม F<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>, op BC<sub>1</sub>, op F<sub>1</sub>, op F<sub>2</sub> ของสบู่ดำกับเข้มปัดตาเวีย โดยใช้ UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc-2.20 โดยอาศัยข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค AFLP



ภาพที่ 30 การกระจายของตัวอย่างในรูปแบบ 3 มิติจากการวิเคราะห์ Principal Component Analysis ของพืชที่นำมาผสม ได้แก่ สบู่ดำ สบู่แดง ผีนตั้น หนุมนานั่งแทน เข้มปัดตาเวีย และลูกผสม F<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>, op BC<sub>1</sub>, op F<sub>1</sub>, op F<sub>2</sub> ของสบู่ดำกับเข้มปัดตาเวีย ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc-2.20k โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิค AFLP

## สรุปและข้อเสนอแนะ

1. ได้ทำการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) ระหว่างสนุ่ดำกับสนุ่แดง สนุ่ดำกับหนุ่มานั่งแท่น สนุ่ดำกับฝิ่นต้น สนุ่ดำกับเข็มปัตตาเวียดอกสีแดงและดอกสีชมพู ทั้งสายตรงและสลับพ่อแม่และยืนยันความเป็นลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ที่ตรวจสอบลูกผสมได้รวม 20 คู่ไพรเมอร์ เป็นไพรเมอร์จำเพาะกับยีน 2 ยีน (*FATA & KAS II* โดยใช้เทคนิค SSCP) และไพรเมอร์จำเพาะกับพันธุ (โดยใช้เทคนิค DFLP) เป็นไพรเมอร์จำเพาะกับเข็มปัตตาเวีย 9 คู่จำเพาะกับสนุ่ดำ 5 คู่จำเพาะกับหนุ่มานั่งแท่น 1 คู่จำเพาะกับฝิ่นต้น 2 คู่และจำเพาะกับสนุ่แดง 1 คู่ร่วมกับการประเมิน phenotype ของลูกผสมที่ได้ สรุปได้ลูกผสม  $F_1$  ทั้งหมด 12 ต้นเป็นลูกผสมระหว่างสนุ่ดำกับเข็มปัตตาเวีย 8 ต้น ลูกผสมระหว่างสนุ่ดำกับฝิ่นต้น 2 ต้น และลูกผสมระหว่างสนุ่ดำกับหนุ่มานั่งแท่น 2 ต้น ส่วนใหญ่เป็นลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมระหว่างสนุ่ดำกับเข็มปัตตาเวีย ยังไม่ได้ลูกผสมระหว่างสนุ่ดำกับสนุ่แดง ลูกผสมมีลักษณะระหว่างพ่อแม่และการจัดกลุ่มโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ AFLP บ่งชี้ว่าสนุ่ดำมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเข็มปัตตาเวียมากที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นการอธิบายการที่คู่ผสมระหว่างสนุ่ดำกับเข็มปัตตาเวียประสบความสำเร็จจากการผสมพันธุ์และได้ลูกผสมมากที่สุด ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง สนุ่ดำกับเข็มปัตตาเวีย สนุ่ดำกับหนุ่มานั่งแท่น สนุ่ดำกับสนุ่แดง สนุ่ดำกับฝิ่นต้น และมีค่า 65, 56, 54 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. ลูกผสม  $F_1$  ระหว่างสนุ่ดำกับเข็มปัตตาเวีย 8 ต้นออกดอกคก มีดอกสีขาวและสีชมพูแดง โดยที่สนุ่ดำกลีบดอกมีสีเหลืองแกมเขียว เข็มปัตตาเวียกลีบดอกมีสีแดง กลีบดอกของลูกผสมมี 5 กลีบเช่นเดียวกับสนุ่ดำและเข็มปัตตาเวีย ขนาดของดอกและใบอยู่ระหว่างสนุ่ดำที่ใช้เป็นแม่และเข็มปัตตาเวียดอกสีแดงที่ใช้เป็นพ่อ ใบมีรูปร่างเป็นหยัก 3-5 พูฐานใบตัด ใบมีสีเขียว แต่บางต้นด้านล่างใบจะมี pigment สีแดงคล้ายกับเข็มปัตตาเวีย ลำต้นลูกผสมทั้งหมดมีลักษณะและสีคล้ายกิ่งไม้เนื้อแข็ง ออกดอกเมื่ออายุ 4-6 เดือน ให้ช่อดอกต่อเนื่องเรื่อยๆ การติดผลของลูกผสม  $F_1$  ก่อนข้างต่ำ ในแต่ละช่อดอกเพียง 1-2 ผล ส่วนใหญ่ผลจะฝ่อ ขนาดของผลลูกผสมเล็กกว่าสนุ่ดำ ผลแก่ของลูกผสม  $F_1$  มีลักษณะแตกและเมล็ดดีดไปไกล (violently dehiscent capsules) เหมือนที่พบในเข็มปัตตาเวีย

3. ลูกผสม  $F_1$  ระหว่างสนุ่ดำกับฝิ่นต้น 2 ต้น มีลักษณะใบหยัก 7 พูกลี ส่วนลูกผสม  $F_1$  ระหว่างสนุ่ดำกับหนุ่มานั่งแท่น 2 ต้น มีลักษณะใบหยัก 3-5 พูตำแหน่งก้านใบเชื่อมกับใบอยู่เยื้องไปทางกลางใบคล้ายหนุ่มานั่งแท่น ลูกผสมจากทั้ง 2 คู่ มีใบสีเขียว ดอกสีชมพู ออกดอกแต่ดอกไม่สมบูรณ์ร่วงง่ายและไม่คิดเมล็ด

4. ได้ผสมกลับระหว่างสนุ่นดำกับลูก  $F_1$  ของสนุ่นดำ-ผืนต้น และ สนุ่นดำ-หนุมนั่งแทน แต่ไม่ติดผล อย่างไรก็ตามการผสมกลับระหว่างสนุ่นดำกับลูก  $F_1$  ของสนุ่นดำ-เข็มปีตดาเวีย ประสบความสำเร็จ ได้ลูกผสมกลับ ( $BC_1$ ) 18 ต้น ลูกผสมกลับ #  $BC_1201^*$  เริ่มออกดอกอายุประมาณ 4 เดือน ดอกมีสีขาวปนชมพูอ่อนรูประฆัง ลูกผสมกลับ #  $BC_1202^*$  ออกดอกคด ดอกสีเขียวอ่อนรูประฆัง #  $BC_1201^*$  และ #  $BC_1202^*$  ออกดอกบอยต่อเนื่อง ลูกผสม #  $BC_1197^*$  ออกดอกคดแต่ติดผลน้อย ลูกผสม  $BC_1$  ส่วนใหญ่สามารถติดผลได้เมื่อปล่อยให้ผสมเปิด ลูกผสม  $BC_1$  ที่มีผลคด ได้แก่ #  $BC_1202^*$ , #  $BC_1196$  และ #  $BC_1217^*$  แต่ #  $BC_1196$  และ #  $BC_1217^*$  ผลมีน้ำหนักเบา ผลของลูก  $BC_1$  ทุกต้นเหมือนสนุ่นดำ คือผลแตกแต่เมล็ดไม่ติดออกจากผล

5. ลูกผสมกลับ ( $BC_2$ ) มี 100 ต้น บางต้นเริ่มออกดอกและมีช่อดอกคด และเริ่มติดผล ลูกผสมกลับ ( $BC_3$ ) มี 20 ต้น มีลูกที่ได้จากการปล่อยให้ผสมเปิด (OP) ของลูกชั่วต่างๆ จำนวน 134 ต้น และลูกจาก  $BC_1 \times F_1$  จำนวน 2 ต้น พบบางต้นมีช่อดอกคด มีดอกสีชมพู ดอกสีเขียวอมขาว ดอกสีขาว ดอกมีทั้งรูปดาวคล้ายเข็มปีตดาเวีย และรูประฆังคล้ายสนุ่นดำ มีความหลากหลายในลักษณะของลูกผสมกลับ และปล่อยให้ผสมเปิดมาก บางต้นให้ผลคด ได้แก่ # 367\* (op  $BC_1202^*$ ), #  $BC_2467^*$  (KUBP 80-3 x  $BC_1202^*$ ), # 359 (OP $BC_1199^*$ ), #  $BC_2526$  ( $BC_1202^*$  x วิชาญ), #  $BC_1196$  (KUBP 78-9 x  $F_112^*$ ), #  $BC_1217^*$  (KUBP 80-3 x  $F_112^*$ ) บางต้นเดี่ยว ได้แก่ # 388\* (OP $BC_1202^*$ ), # 319 (OP $BC_1195^*$ ), # 386 ( $BC_1202^*$  x  $F_15^*$ ), #  $BC_2526$  ( $BC_1202^*$  x วิชาญ), # 495 (OP $BC_1202^*$ ), # 569 (OP ผลแดง) บางต้นไม่เป็นโรค ได้แก่ # 490 (OP $BC_1202^*$ ), # 386 ( $BC_1202^*$  x  $F_15^*$ ), # 569 (OP ผลแดง), # 319 (OP $BC_1195^*$ ) บางต้นตอบสนองต่อ BA ดี ได้แก่ # 489 (op  $BC_1202^*$ ), #  $BC_1196$  (KUBP 78-9 x  $F_112^*$ ) และบางต้นให้ดอกคด ได้แก่ #  $BC_1197^*$  (KUBP 78-9 x  $F_112^*$ ), # 495 (OP $BC_1202^*$ ), # 312\* (OP $BC_1202^*$ ), # 313 (OP $BC_1202^*$ ), #  $BC_1202^*$  (72 x  $F_1137^*$ ), #  $BC_1201^*$  (72 x  $F_1137^*$ ) ลูกผสมที่มีลักษณะดีเหล่านี้จะเป็นประโยชน์เพื่อการเผยแพร่ และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

6. ผลการย้อมเรณูลูก  $F_1$  ติดสีเขียวเหมือนกับเรณูของพ่อแม่แสดงลักษณะความมีชีวิตสูง การศึกษาการงอกของเรณูภายใต้ fluorescence microscopy พบว่าเรณูเริ่มมีการงอก หลังการถ่ายเรณู 30 นาที และหลอดเรณูเจริญถึงรังไข่ใช้ระยะเวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง พบหลอดเรณูจำนวนมากในคู่ผสมส่วนใหญ่โดยเฉพาะในคู่ผสมที่ใช้ ลูกผสม  $F_1$  เป็นแม่และสนุ่นดำเป็นพ่อ ไม่พบการบิดเกลียวของหลอดเรณู ไม่น่าจะมีอุปสรรคในการผสมกลับ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในลูกผสมบางต้นพบว่าลูกผสมที่มีน้ำหนักผลและเมล็ดเบา มีปริมาณน้ำมันน้อย ลูกผสม # BC<sub>1</sub>196 ให้ผลคบน้ำหนักผลและเมล็ดเบา มีน้ำมันในเนื้อในเมล็ดเพียง 29.92 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลูกผสมที่ให้ปริมาณน้ำมันมากคือ ลูกผสม # BC<sub>1</sub>202\* และ ลูกผสม # OPBC<sub>1</sub>367\* มีน้ำมันในเนื้อในเมล็ดที่ 50.93 เปอร์เซ็นต์ และ 49.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับใกล้เคียงกับพันธุ์เช็ก KUBP78-9 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตดี คัดเลือกโดยโครงการ KU Biodiesel มีน้ำมันในเนื้อในเมล็ด 49.12 เปอร์เซ็นต์

8. การทดลองให้สาร BA แก่สบู่ดำ และลูกผสมเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการใช้เพิ่มผลผลิตสบู่ดำ พบว่า สาร BA ช่วยเพิ่มจำนวนดอกและดอกเพศเมียอย่างชัดเจน ช่อดอกที่ฉีด BA เจริญเร็วกว่าช่อที่ไม่ได้รับ BA พบดอกกระเทยในบางพันธุ์ที่ได้รับสาร BA สบู่ดำแสดงการตอบสนองต่อการให้สาร BA ที่ความเข้มข้น 160 ppm มากกว่า 80 ppm

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กัญญ์ชดี เกษมสวัสดิ์. 2532. การปฏิสนธิและการเจริญของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กนกวรรณ แดงสวัสดิ์. 2551. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จร สดากร. 2527. สมุดคำพืชศึกษาภาพสูงเพื่อพลังงานทดแทนของประเทศไทย. วารสารวิชาการเกษตร. 1: 67-71.
- ชำนานู ฉัตรแก้ว, ทวี เก่าศิริ, อวบ สารถ้อย, กิตติเดช โพธิ์นิยม, ประโยชน์ ตันติเจริญยศ, จิรชนม์ ศรีสวัสดิ์เล็ก, บำรุง ไตรมนตรี, สมศักดิ์ ศรีสมบุญ, ชาญวิทย์ ม่วงมิตร และ กรีก นฤทุม. 2549. สมุดคำพืชพลังงาน. สำนักพิมพ์ ฟีนี ฟับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.
- ญาตวี รัตน มณี. 2553. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสมุดคำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ผ่องพรรณ จรัสจินดารัตน์. 2538. การงอกและการเจริญของละอองเรณูของข้าว *Oryza* หลังจากการผสมตัวเอง และผสมข้ามชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรชัย เหลืองอากาศ. 2549. สมุดคำเพื่อไปโอติเซล. สำนักพิมพ์มติชน, กรุงเทพฯ.
- พิชัย มณีโชติ และ วัฒนา เสถียรสวัสดิ์. 2552. ลักษณะโดยทั่วไป และลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสมุดคำและพืชในสกุลจatropha (*Jatropha*) ที่พบในประเทศไทย. บริษัท ลัดดา จำกัด. กรุงเทพฯ.
- พีรเดช ทองอำไพ. 2529. ฮอรัโมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. สำนักพิมพ์ไคนามิคการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ไพจิตร จันทร์วงศ์, วีรศักดิ์ อนันบุตร, วิไลศรี ลิ้มพยอม และ สุปรียา สุขเกษม. 2530. คู่มือการใช้ประโยชน์และการตรวจสอบคุณภาพพืชน้ำมันและน้ำมันพืช 52 ชนิด. สายงานเคมีพืชน้ำมันและสารธรรมชาติ, กองเกษตรเคมี, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ หน้า 14-15.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2527. หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, หาดใหญ่.

ระพีพันธ์ ภาสบุตร และ สุขสันต์ สิทธิผลไพบูลย์. 2525. ผลการวิจัยค้นคว้าการใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นพลังงานทดแทนในเครื่องยนต์ดีเซล. น. 11-14. ใน การใช้น้ำมัน สบู่ดำเดินเครื่องยนต์ดีเซล. กองเกษตรเคมีและกองวิศวกรรมกรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

เรวดี กรประชา, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, อรุณี อิงคากุล และ สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช. 2549. การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับคัดเลือกลูกผสมระหว่าง T5 และ A17. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

รมย์ริณ ปิยามย์. 2537. การเพิ่มการติดผลของสละเนินวงโดยการผสมเกสรและการใช้จิบเบอเรลลินเอซิด. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

\_\_\_\_\_. 2542. วิธีการเก็บรักษาละอองเรณูระกำ (*Salacca wallichiana* Mart.) ในไนโตรเจนเหลว ปัญหาพิเศษปริญญาโทภาควิชาพืชสวน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตนวรรณ วิเศษ. 2532. การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการติดผลและการใช้สารเคมีควบคุมการติดผลและการหลุดร่วงของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ทะวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิมลรัตน์ สุกรินทร์, มณเฑียร โสมภีร์, H. Goco และ นาค โพธิ์แท่น. 2533. การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตของสบู่ดำโดยการฉายรังสีแกมมา. ข้อมูลงานวิจัย ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

ศักดิ์กรีนน้ำใจทหาร. 2536. อิทธิพลของการผสมเกสรมะม่วงพันธุ์เขียวเสวยโดยใช้เกสรตัวผู้พันธุ์ต่างๆ ต่อการติดผล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรินันท์ สุวรรณน้อย. 2554. การศึกษาพันธุกรรมของการผสมข้ามสกุลและข้ามชนิดเพื่อการปรับปรุงพันธุ์สับดูดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริศักดิ์ สุนทรยาตร, วิภา หงษ์ตระกูล, นิตย์ศรี แสงเดือน, สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล, แอนนา สายมณี, รัตน์ประภา ศรีพิจิตร, วิเชียร กীরตินิจกาล และเพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2550. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสับดูดำโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี ใน โครงการสัมมนาวิชาการเรื่อง การประชุมวิชาการสับดูดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1. ณ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, 29-30 พฤษภาคม 2550.

ศูนย์วิชัยพืชสวนจันทบุรี. 2539. เอกสารวิชาการเรื่องพืชสกุลระกำ. สถาบันวิจัยพืชสวน. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 19 น.

ลจี อิ่มแดง. 2547. การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้บ่งชี้ลักษณะเพศและความหลากหลายทางชีวภาพของปรังสกุล *Cycas* และ *Zamia* โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบัติ ชินะวงศ์. 2548. ไบโอดีเซลและโอกาสของสับดูดำ, น. 26-34. ในเอกสารสัมมนาวิชาการ. บริษัท มติชน จำกัด(มหาชน), กรุงเทพฯ.

สุนิดา มะยูโซ๊ะ. 2549. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ปลูกในประเทศไทยโดยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยทักษิณ.

สุปราณี สิทธิพรหม. 2549. การระบุระดับโมเลกุลพันธุ์ลำไย ปทุมมา กวาวเครือ และมะเดื่อ โดยใช้เครื่องหมาย SCAR. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปรัชญา รัชมีธรรมวงศ์. 2537. การเพาะปลูกและการดูแลรักษาทุ่น้ำ. เพชรกระรัต, กรุงเทพฯ.

อารีย์ อนุวัฒน์. 2552. การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ระบุชนิดของพืชสกุล  
หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Adebowale, K. O. and C. O. Adedire. 2006. Chemical composition and insecticidal properties of  
the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. **Afr. J. Biotechnol.** 5: 901-906.

AOAC. 2000. **Oils and Fat**, pp 23-25. In Official Methods Analysis of AOAC International, 17  
Th ed. **Official Method** 940.28.

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

Babik, B., L. spiss and H. Goral. 1982. **Use of fluorescence microscopy for evaluation of  
self-incompatibility level in White clover (*Trifolium repens* L.).** (English translation  
from Poland). Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej in Huguona Kollataja w Krakowie  
Roimictwo. 167: 31-38.

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

Bassiri, A. , F. Ahmad and A. E. Slinkard. 1987. Pollen grain germination and pollen tube growth  
following in vivo and in vitro self and interspecific pollinations in annual Cicer species.  
**Euphytica** 36: 667-675.

Becker, K., and G. Francis. 2000. **Bio-diesel from Jatropha plantations on degraded land**,  
Department of Aquaculture Systems and Animal Nutrition, University of Hohenheim,  
Stuttgart, Germany.

- 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, Heidelberg**, 119-134.
- Dehgan, B. 1984. Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha*. **Syst. Bot.** 9: 467-478.
- De Oviira, S. J., P. M. Leite, L. B. De Souza, V. M. Mello, E. C. Silva, J. C. Rubim, S. M. P. Meneghetti and P. A. Z. Suarze. 2009. Characteristic and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcus* L. oil and application for biodiesel production. **Biomass Bioenerg.** 33: 449 - 453.
- Dhillon, R.S., M.S. Hoodar, M. jattan, V. Chawla, M. Bhadwaj and S. C. Goyal. 2009. Development and molecular characterization of interspecific hybrids of *Jatropha curcus* x *J. integerrima*. **Indian J. Technol.** 8: 384-390.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf. **Phytochem. Bul.** 19: 11-15.
- Gedil, M., F. Kolade, A. Raji, I. Ingelbrecht and A. Dixon. 2009. Development of molecular Genomic tools for verification of intergeneric hybrids between castor bean (*Ricinus communis* L.) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **JFAE.** 7: 534-539.
- Gurr, M.I., J. L. Harwood, K.N. Frayn. 2002. **Lipid Biochemistry**. Blackwell Science Ltd. 336
- P.Hawkins, D. J. and J. C. Kridl. 1998. Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola. **Plant J.** 13:743-52.
- Heslop-Harison, J. 1968. Pollen wall development science. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 161: 230-237.

- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein. 1985. Individual specific fingerprints of human DNA. **Nature** 316: 76-79.
- Joker, D. and J. Jepsen. 2003. *Jatropha curcas* L. **Seed leaflet**. Danida Forest Seed Centre. Humlebaek, Denmark. (83): 2.
- Joly, K., C. Nellemann, and I. Vistnes. 2006. A reevaluation of caribou distribution near an oilfield road on Alaska' s North Slope. **Wildlife. Soc. B.** 34: 866–869.
- Kaushik, N., K. Kumar, S. Kumar, N. Kaushik and S. Roy. 2007. Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. **Biomass Bioenerg.** 31: 497-502.
- Kho, Y.O. and J. Bear. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. **Euphytica** 17: 298 - 302.
- Kumari, A., R.Komal, R. Rajesh. 2009. *In Vitro* pollen germination, pollen tube growth and pollen viability in *Trichosanthes dioica* Roxb. (Cucurbitaceae). **Plant. Rep. Bio.** 1: 147-151.
- Lakshminarayana, M. and M. Sujatha. 2001. Screening of *Jatropha* species against the major defoliators of castor (*Ricinus communis* L.). **J. of Oilseeds Res.** 18: 228-230.
- Lansari, A. and A. Lezzoni. 1990. A preliminary analysis of self-incompatibility in sour cherry. **Hort. Sci.** 25: 1368-1636.
- Leopold, A. C. and P. E. Kreidemann. 1975. **Plant growth and development**. 2d ed., Tata Mcgraw-Hill, New Delhi. 545 p.

- Luo, C. W., K. Li, Y. Chen, Y. Y. Sun and W. Y. Yang. 2007. Pollen viability, stigma receptivity And reproductive features of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Sinica**. 2: 1994-2001.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the styles by means of fluorescence. **Stain Technol.** 34: 125-128.
- Minami, M., M. Gomi and A. Ujihara. 1992. Pollen tube growth in the interspecific crosses in *Fagopyrum*. **Journal of faculty of Agriculture Sihnshu University**. 29: 129-135.
- Openshaw, H. 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass Bioenerg.** 19: 1-15.
- Ohkawa, K. 1979. Effects of gibberellins and benzyladenine on dormancy and flowering of *Lilium speciosum*. **Sci. Hort.** 10: 255-260.
- Ohsako, T. G., Z. Wang and N. T. Miyashita. 1996. Polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism analysis of intra-and interspecific variations in organellar DNA regions of *Aegilopsmutica* and related species. **Genes & Genet. Syst.** 71: 281-292.
- Openshaw, Keith., 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass Bioenerg.** 19: 1-15.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kasazawa, K. Hayashi and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 86: 2766-2770.
- Pamidimarri, D. V. N. S., N. Pandya, M. P. Reddy and T. Radhakrishnan. 2008. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. **Molec. Biol. Rep.** 901 - 907.

Pan, B. Z and Z. F Xu. 2011. Benzyladenine treatment significantly increases the seed yield of the

biofuel plant *Jatropha curcas*. **J. Plant Growth Regul.** 30: 166 -174.

Parthiban, K. T., R. S. Kumar, P. Thiyagarajan, V. Subbulakshmi, S. Vennila and M.G. Rao.

2009. Hybrid progenies in *Jatropha* – a new development. **Current Science**

96: 815 - 823.

Pimienta, E., V.S. Polito and D.E. Kester. 1983. Pollen tube growth in cross self-pollinated

‘Non pareil’. **Hort. Sci.** 108: 643 - 647.

Prabakaran, A.J. and M. Sujatha. 1999. *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja, a natural

interspecific hybrid occurring in Tamil Nadu, India. **Genet. Resour. Crop Evol.**

46: 213 - 218.

Prat, L., C. Botti and T. Fichet. 2008. Effect of plant growth regulators on floral differentiation

and seed production in jojoba (*Simonsia chinensis* (Link) Schneider). **Ind. Crop Prod.**

27: 44 - 49.

Raja, S. A., D. S. R. Smart and C. L. R. Lee. 2011. Biodiesel production from jatropha oil and

its characterization. **Res. J. Chem. Sci.** 1: 81- 87.

Ram, S. G., K. T. Parthiban, R. S. Kumar, V. Thiruvengadam and M. Paramathma. 2007. Genetic

diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genet. Resour. Crop**

**Evol.** 55: 803 - 809.

Ramana, M. S. and C. A. Mutsaerts. 1971. Unusual behavior of growing pollen tubes in the styles

and ovules of *Spinacia oleracea* L. **Euphytica** 20: 145 - 151.

Ranade, S. A., A. P. Srivastava, T. S. Rana, J. Srivastava and R. Tuli. 2008. Easy assessment of

- diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biomass Bioenerg.** 32: 533 - 540.
- Rao, K. S., and G. Lakshminarayana. 1987. Characteristics and composition of six newer seeds and the oils. **Fat Sci. Tech.** 89: 324 - 326.
- Ravestjin, W. V. 1969. Setting of fruit in tomato, pepper and strawberries. **Annual report Glasshouse crop research and experiment station.** Naaldwijk, Netherland. 95p.
- Ravetta, D. and D. Palzkill. 1992. The effect of growth regulators and apex removal on branching and flower bud production of jojoba. **Ind. Crop Prod.** 1: 47 - 55.
- Reddy, K. R. K., N. Ramaswamy and B. Bahadur. 1987. Cross incompatibility between *Ricinus* and *Jatropha*. **Plant Cell Incompat. Newslett.** 19: 60 - 65.
- Reger, B. J. and J. Jame. 1982. Pollen germination and tube growth of Sorghum when cross to mize and peal millet. **Crop Sci.** 22: 140 - 144.
- Sasikala, S., N. Tanaka, H. S. Y. W. Wah and K. B. S. N. Jinadasa. 2009. Effects of water level fluctuation on radial oxygen loss, root porosity and nitrogen removal in subsurface vertical flow wetland microcosms. **Ecology. Eng.** 35: 410 - 417.
- Sirisomboon, P., P. Kitchaiya, T. Pholpho and W. Mahuttanyavanitch. 2007. Physical and mechanical properties of *Jatropha curcas* L. fruits, nuts and kernels. **Biomass Bioenerg.** 97: 201 - 207.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. **Numerical taxonomy.** Freeman. San Francisco, USA.
- Soontornchainaksaeng, P. and T. Jenjittikul. 2003. Karyology of *Jatropha* (Euphorbiaceae) in Thailand. **Thai For. Bull. Bot.** 31: 105 - 112.
- Stott, K. G. 1972. Pollen germination and pollen tubes characteristic in a range of apple cultivars.

**Hort. Sci.** 47: 191 - 198.

Subramanian, K. A., S. K. Singal and M. Saxena, S.Singhal. 2005. Utilization of liquid biofuels in automotive diesel engines: an Indian perspective. **Biomass Bioenerg.** 29: 65 - 72.

Sujatha, M. 1996. **Genetic and tissue culture studies in castor (*Ricinus communis* L.) and related genera.** Ph.D. Thesis, Osmania University, Hyderabad, India. 295 pp.

Sujatha, M. 2009. **Biotechnological intervention for improving *Jatropha* and castor for biofuels.** Petrotech, 11 - 15 January 2009, New Delhi, India.

Sujatha, M. and A.J. Prabakaran. 2003. New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization. **Genet. Resour. Crop Evol.** 50: 75 - 82.

Sujatha, M., T.P. Reddy and M.J. Mahasi. 2008. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotech. Adv.** 26: 424 - 435.

Mazliak, P. 1994. Desaturation processes in fatty acid and acyl lipid biosynthesis. **J. Plant Physio.** 143: 399 - 406.

Tanksley, S.D., M. W. Ganai and G. B. Martin. 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genome. **Trends Genet.** 11: 63 - 68.

Vos ,P. and M. Kuiper. 1997. AFLP analysis, pp. 115 - 131. *In* Caetano-Anolles and Gresshoff (eds.). **DNA Markers. Protocols, Applications, and Overviews.** Wiley-Liss, Inc., New York.

Vijana, V., N. Senthil, S. Vellaikumar and M. Paramathma. 2009. Genetic diversity of india jatropah species as revealed by morphological and ISSR marker. **Crop Sci. Biotech.** 12: 115 - 120.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. I. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.

**Nucl. Acids Res.** 18: 6231 - 6235.

Williams, R. R., P. Brain, R. M. Chruch and V. A. Flood. 1984. Flower receptivity, pollen transfer and fruit set variation during a single flowering period of Cox's orange pippin. **Hort. Sci.** 59: 337 - 347.

Wilms, H. J. 1974. Branching of pollen tubes in spinach, pp. 155 - 160. *In* H.E. Linskens (ed.).

**Fertilization in higher plants.** North-Holland Pub. Co., The Netherlands.

Yano, F. S. Tokumasu and M. Kato. 1974. The behavior of pollen tubes and the developmental process of ovule in *Pelargonium*. College of Agriculture, Ehime University,

Matsuyama, Japan. **Euphytica** 24: 251 - 259.

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวปกฉัตร กุศลกรรมบถ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	30 มีนาคม 2529
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (พ.ศ. 2551)
ตำแหน่งหน้าที่การงาน ปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-

